

THESE

présentée

A L'U.E.R. DES SCIENCES DE LA NATURE DE L'UNIVERSITE DE NANTES

par

Didier RENAUD

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES - SCIENCES NATURELLES

ETUDE ELECTROPHYSIOLOGIQUE

DE LA DIFFERENCIATION CARDIAQUE CHEZ L'EMBRYON DE POULET

Texte du mémoire

Soutenue le 26 Juin 1973 devant la Commission d'examen

M. G.	LE DOUARIN, Professeur	Président
Mme N.	LE DOUARIN, Professeur	Examineurs
M. E.	CORABOEUF, Professeur	
M. Y.M.	GARGOUÏL, Professeur	

sous la présidence d'honneur de M. Et. WOLFF
Professeur au Collège de France, Membre de l'Institut

Digitized by the Internet Archive
in 2026

THESE

présentée

A L'U.E.R. DES SCIENCES DE LA NATURE DE L'UNIVERSITE DE NANTES

par

Didier RENAUD

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES - SCIENCES NATURELLES

ETUDE ELECTROPHYSIOLOGIQUE

DE LA DIFFERENCIATION CARDIAQUE CHEZ L'EMBRYON DE POULET

Texte du mémoire

Soutenue le 26 Juin 1973 devant la Commission d'examen

M. G. LE DOUARIN, Professeur	Président
Mme N. LE DOUARIN, Professeur	Examineurs
M. E. CORABOEUF, Professeur	
M. Y.M. GARGOUIL, Professeur	

sous la présidence d'honneur de M. Et. WOLFF
Professeur au Collège de France, Membre de l'Institut

THÈSE

présentée

A L'U.E.R. DES SCIENCES DE LA NATURE DE L'UNIVERSITÉ DE NANTES

par

David BÉRAUD

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES NATURELLES

ÉTUDE ÉLECTROPHYSIOLOGIQUE

DE LA DIFFÉRENCIATION CARDIAQUE CHEZ L'EMBRYON DE POULET



Tout est permis

Soutenue le 26 Juin 1973 devant la Commission d'examen

Examinateurs	M. G. LE DUBARRY, Professeur	Président
	Mme N. LE DUBARRY, Professeur	
	M. E. CORABEUR, Professeur	
	M. Y. GARCIA, Professeur	

sous la présidence d'honneur de M. Et. BOUFFE
Professeur au Collège de France, Membre de l'Institut

UNIVERSITE DE NANTES

Président :	M. J. -P. KERNEIS	Médecine
Vice-Président :	M. J. PETRESCO	Mathématiques
Secrétaire général :	M. A. LERAY	

- - - - -

U. E. R. de l'Ensemble administratif Sciences

Professeurs

MM.	G. BRILLOUET	Mathématiques
	C. PAUC	"
	J. PETRESCO	"
	R. RAFFIN	"
MM.	P. AVIGNON	Physique
	A. BOULOU	"
	L. COLLET	"
	S. MINN	"
	H. MOUTON	"
MM.	J. -M. DUNOYER	Chimie
	Y. GRAFF	"
	G. MARTIN	"
	J. PIERI	"
	H. QUINIOU	"
	J. ROUXEL	"
	B. WOJTKOWIAK	"
M.	P. CAVET	Sciences de la Nature
Melle	G. DEBREAUX	"
M.	R. GARRIGUES	"
Mme	N. LE DOUARIN	"
MM.	G. LE DOUARIN	"
	R. SELLIER	

Professeurs sans chaire

M.	H. IBISCH	Mathématiques
MM.	J. -P. BARDON	Physique
	G. GOUREAUX	"
	W. LASKAR	"
M.	M. TOURNOUX	Chimie
MM.	P. DUPONT	Sciences de la Nature
	F. OTTMANN	"
	Y. SAUDRAY	"

Maîtres de Conférences

MM.	J. DHOMBRES	Mathématiques
	A. FOUQUES	"
	J. GAPAILLARD	"
	M. GATESSOUE	"
	D. LEBORGNE	"
	PHAN-THE-LAI	"
	P. VOGEL	"
MM.	R. LE BIHAN	Physique
	R. LE MAITRE	"
	P. LONCKE	"
	L. ROSIER	"
M.	M. CHABANEL	Chimie
Mme	M. MARTIN	"
MM.	L. AMOURICQ	Sciences de la Nature
	F. FORESTIER	"
	D. LEBRUN	"
	A. NICOLAS	"
Mme	D. NICOLAS-PRATT	"

AVANT - PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Physiologie animale et cellulaire de l'U.E.R. des Sciences de la Nature de l'Université de Nantes sous la direction de Monsieur le Professeur G. LE DOUARIN.

A la création du Laboratoire, Monsieur le Professeur G. LE DOUARIN a bien voulu me confier un travail concernant l'étude de la différenciation cardiaque chez l'embryon de poulet. Ses travaux, ses rapports étroits avec d'autres Laboratoires et son érudition m'ont permis d'acquérir une formation scientifique immédiatement applicable à l'étude des problèmes qui ont été abordés. Par l'ambiance qu'il a su créer, par ses conseils, ses suggestions et sa disponibilité, il m'a apporté une aide morale et matérielle de tous les instants. Il m'est agréable de le remercier tout particulièrement pour ses encouragements et sa participation à la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond respect, de ma reconnaissance et de ma sincère admiration.

Je remercie Madame le Professeur N. LE DOUARIN qui m'a fait profiter de ses vastes connaissances et qui, par ses critiques bienveillantes et amicales, par ses suggestions et ses encouragements a contribué efficacement à la réalisation de ce travail. Je tiens à l'assurer de ma profonde gratitude et à lui témoigner ma respectueuse admiration.

Qu'il me soit permis de souligner ici tout le profit que j'ai retiré de l'étroite collaboration des Laboratoires de Physiologie animale et cellulaire et d'Embryologie. L'atmosphère de travail et l'ambiance d'équipe créées par les deux Maîtres qui les dirigent m'ont permis de surmonter bien des difficultés.

Monsieur le Professeur Etienne WOLFF, Administrateur du Collège de France, Membre de l'Institut, a bien voulu accepter la Présidence d'honneur de mon Jury de thèse. Il a suivi avec bienveillance la progression de mes recherches et présenté à l'Académie des Sciences les Notes qui en ont marqué les étapes. Je suis conscient de bénéficier de l'intérêt qu'il porte à l'activité de l'Equipe à laquelle j'appartiens. Je suis extrêmement sensible au très grand honneur qu'il me fait en jugeant mon travail et je le prie de recevoir le témoignage de ma très respectueuse admiration et de ma profonde gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur E. CORABOEUF qui m'a fait l'honneur d'examiner ce mémoire. Ayant eu, à de nombreuses reprises, le privilège de profiter de sa grande compétence, je voudrais le remercier pour les précieux conseils qu'il m'a prodigués et pour l'intérêt qu'il a manifesté à la progression de mon travail. Je n'oublie pas non plus les possibilités qu'il m'a offertes en me permettant de faire des stages dans son Laboratoire et le profit que j'en ai retiré. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance et à lui exprimer mes très sincères remerciements.

J'exprime toute ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Y. M. GARGOUIL qui a bien voulu examiner ce travail. Sa compétence dans le domaine de l'analyse électrophysiologique du développement cardiaque me rend très sensible à l'honneur qu'il me fait. Je lui suis très reconnaissant de la bienveillance qu'il m'a toujours témoignée.

Etudiant à Poitiers, j'ai reçu l'enseignement de la Physiologie animale dispensé par Monsieur le Professeur E. CORABOEUF et par Monsieur le Professeur Y. M. GARGOUIL. Qu'ils me permettent de leur dire que l'enthousiasme qu'ils savent susciter pour cette science n'est pas étrangère à l'orientation que j'ai eu la chance de pouvoir prendre. Je suis particulièrement heureux d'avoir pu m'initier à la recherche dans un domaine de la Physiologie cellulaire où les Laboratoires d'Orsay, de Poitiers et de Nantes entretiennent de fréquents et profitables contacts.

Je tiens à assurer de ma gratitude Monsieur le Professeur J. BRUNER, qui a bien voulu avec une constante gentillesse m'éclairer de ses conseils lors de ses fréquents séjours au Laboratoire et qui m'a apporté sans compter son aide. Je l'en remercie très vivement et l'assure de toute mon amitié.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mes Collègues du Laboratoire de Physiologie animale et cellulaire et du Laboratoire d'Embryologie pour leur esprit d'entraide, leur compréhension et leur amitié qui ont grandement favorisé ce travail.

Que tout le personnel technique trouve ici le témoignage de ma fidèle amitié et accepte mes remerciements sincères pour l'aide spontanée et le dévouement qu'il a manifesté à mon égard.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	
I - <u>Embryologie du coeur de poulet</u>	
1. Les potentialités cardiogénétiques du blastoderme	4
2. La morphogenèse cardiaque	5
3. L'établissement de l'innervation cardio-régulatrice	6
II - <u>Aspects cellulaires de la différenciation cardiaque</u>	
1. Aspects ultrastructuraux	8
2. Aspects immunochimiques	10
3. Aspects électrophysiologiques	10
4. Sensibilité du coeur aux neurotransmetteurs	12
A - Effets des substances adrénérgiques	12
B - Effets des substances cholinérgiques	16
III - <u>Activité électrique des structures excitables</u>	
1. La théorie ionique	19
A - Le potentiel membranaire de repos	19
B - Le potentiel d'action	22
2. Propriétés électriques de la membrane cardiaque	24
3. Activité électrique des tissus cardiaques embryonnaires ...	28
A - Coeur embryonnaire de poulet	29
B - Coeur embryonnaire de Mammifères	30
C - Coeurs embryonnaire et larvaire d'Amphibiens	31
IV - <u>Action de facteurs ioniques sur l'activité électrique cardiaque</u>	
1. Rôle des ions sodium	33
2. Rôle des ions calcium	35
3. Rôle des ions potassium	36

MATERIEL ET METHODES

I - <u>Techniques de préparation du matériel expérimental</u>	
1. Technique de prélèvement du blastoderme	39
2. Réalisation de préparations cardiaques à partir de jeunes embryons	39
3. Prélèvement de préparations cardiaques à partir d'embryons âgés	40
4. Obtention de préparations ventriculaires automatiques ...	40
5. Méthode d'isolement du mésoderme précardiaque	41
II - <u>Techniques de culture in vitro</u>	41
III - <u>Liquides de perfusion</u>	
1. Milieu de perfusion "normal"	42
2. Milieux de perfusion déséquilibrés ioniquement	43
3. Addition d'inhibiteurs de perméabilités	43
4. Action de substances pharmacologiques	44
IV - <u>Enregistrement des phénomènes électriques</u>	
1. Cuve de perfusion	45
2. Méthode d'enregistrement de l'activité électrique	45
3. Entraînement électrique	46
4. Applications de courants transmembranaires imposés ...	46

RESULTATS

PREMIERE PARTIE :

=====

A - DIFFERENCIATION DU TISSU MYOCARDIQUE EN CULTURE IN VITRO

I - Evolution en culture <u>in vitro</u> du feuillet mésodermique isolé de l'aire cardiaque	50
1. Culture du feuillet mésodermique sur milieu gélosé ...	50
2. Culture du mésoderme précardiaque en milieu liquide .	50

II - Influence de l'environnement tissulaire sur l'évolution du mésoderme précardiaque en culture <u>in vitro</u>	52
1. Evolution en culture <u>in vitro</u> de l'aire cardiaque présomptive	53
a - culture en milieu liquide	53
b - culture sur milieu gélosé	54
2. Influence de l'endoderme sur la différenciation du mésoderme précardiaque	54
a - Evolution du mésoderme précardiaque cultivé au contact de l'endoderme de l'aire cardiaque	55
b - Evolution du mésoderme précardiaque cultivé au contact d'un feuillet endodermique prélevé en dehors de l'aire cardiaque	55
3. Influence de l'ectoderme sur la différenciation du mésoderme précardiaque	56
a - Evolution du mésoderme précardiaque cultivé au contact de l'ectoderme cardiaque	57
b - Evolution du mésoderme précardiaque cultivé au contact d'un ectoderme prélevé en dehors de l'aire cardiaque	57
III - Conclusions	59
B - <u>ACTIVITE ELECTRIQUE DU TISSU MYOCARDIQUE</u> <u>EMBRYONNAIRE.</u>	
I - Activité électrique intracellulaire du myocarde embryonnaire	62
1. Les potentiels d'action du coeur embryonnaire au 2ème jour de l'incubation	62

2. Les potentiels d'action du coeur embryonnaire de 3 jours d'incubation	63
3. Les potentiels d'action du coeur embryonnaire de 4 jours d'incubation	64
4. Potentiels d'action du lambeau ventriculaire de 19 jours d'incubation	64
II - Activité électrique du tissu myocardique différencié en culture <u>in vitro</u> par le mésoderme isolé de l'aire cardiaque	65
III - Activité électrique des tubes cardiaques différenciés en culture <u>in vitro</u> en milieu liquide	67
IV - Conclusions	69

DEUXIEME PARTIE :

=====

A - ACTION DES CATECHOLAMINES

I - Les effets chronotropes des catécholamines sur le coeur de l'embryon de poulet à différents stades du développement	75
1. Action de l'adrénaline	75
2. Action de la noradrénaline	77
II - Action de l'adrénaline sur le tissu myocardique différencié en culture <u>in vitro</u>	81
1. Action de l'adrénaline sur le rythme des contractions des explants	81
2. Action de l'adrénaline sur l'activité électrique	84
III - Conclusions	85
1. Les effets des catécholamines sur le rythme cardiaque	85
2. Les effets des catécholamines sur l'activité électrique	89

B - MISE EN EVIDENCE D'UNE SUBSTANCE CHOLINER-
GIQUE DANS LE TISSU MYOCARDIQUE ANEURAL
DIFFERENCIE IN VITRO.

I - Effets de l'entraînement électrique des préparations myocardiques différenciées en culture <u>in vitro</u>	93
1. Les modifications de l'activité électrique	93
2. Facteurs influant sur la durée de l'I. P. S.	93
II - Activités cholinestérasiques du tissu myocardique aneural	96
1. Activité cholinestérasique des tubes cardiaques d'embryons de 2 jours d'incubation	98
2. Activité cholinestérasique des tubes cardiaques différenciés en culture <u>in vitro</u>	98
3. Activité cholinestérasique du tissu myocardique différencié en culture <u>in vitro</u> à partir du méso- derme isolé de l'aire cardiaque	99
III - Conclusions	99

TROISIEME PARTIE : INFLUENCE DES CONDITIONS IONIQUES
=====

DU MILIEU SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE CELLULAIRE.

A - ACTIONS DES VARIATIONS DE LA CONCENTRATION
EXTERNE EN IONS SODIUM.

I - Action d'un milieu hyposodique sur le rythme cardiaque aux jeunes stades du développement	105
II - Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire	106

a. Modifications de l'activité électrique du coeur embryonnaire de 2 jours	107
b. Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique du coeur embryonnaire de 3 jours	107
c. Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique du coeur embryonnaire de 4 jours	108
d. Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique du coeur embryonnaire de 19 jours	108
III - Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique du tissu myocardique en culture <u>in vitro</u>	109
1. Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique des fragments ventriculaires de coeurs embryonnaires de 4 jours placés en culture <u>in vitro</u> ...	109
2. Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique du tissu myocardique différencié en culture <u>in vitro</u>	110
IV - Conclusions	111
 B - <u>EFFETS DES MILIEUX HYPOCALCIQUES SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE CARDIAQUE EMBRYONNAIRE.</u>	
I - Effets des milieux hypocalciques sur l'activité électrique ventriculaire du coeur <u>in situ</u>	114
1. Modifications de l'activité électrique du ventricule du coeur de l'embryon de 2 jours d'incubation	114
2. Modifications de l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire à 3 jours d'incubation	115
3. Modifications de l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire au stade de 4 jours d'incubation ..	116

4. Modifications de l'activité électrique des lambeaux ventriculaires de coeurs embryonnaires âgés	116
II - Effets des milieux hypocalciques sur l'activité électrique du tissu myocardique en culture <u>in vitro</u>	117
1. Action des milieux hypocalciques sur l'activité électrique des fragments ventriculaires <u>in vitro</u>	117
2. Modifications de l'activité électrique du tissu myocardique différencié en culture <u>in vitro</u> à partir du mésoderme précardiaque	118
III - Conclusions	119
C - <u>EFFETS DES MILIEUX HYPOPOTASSIQUES SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE CARDIAQUE EMBRYONNAIRE</u>	
I - Effets des milieux hypopotassiques sur l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire <u>in situ</u>	123
1. Action des milieux hypopotassiques sur l'activité électrique du ventricule du coeur embryonnaire au 2ème jour de l'incubation	123
2. Action des milieux hypopotassiques sur l'activité électrique ventriculaire du coeur de l'embryon de 3 jours	123
3. Modifications de l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire de 4 jours	124
4. Modifications de l'activité électrique du lambeau ventriculaire du coeur embryonnaire de 19 jours	125
II - Effets des milieux hypopotassiques sur l'activité électrique du tissu myocardique cultivé <u>in vitro</u>	126

1. Activité électrique de fragments myocardiques ventriculaires d'embryon de 4 jours dans les milieux hypopotassiques	126
2. Modifications de l'activité électrique du tissu myocardique différencié en culture <u>in vitro</u>	127
III - Conclusions	127

QUATRIEME PARTIE : ETUDE, PAR L EMPLOI D'INHIBITEURS,
=====
DES PERMEABILITES IONIQUES MEMBRANAIRES DU
TISSU MYOCARDIQUE EMBRYONNAIRE DE POULET.

A - EFFETS DES INHIBITEURS DE PERMEABILITE IONIQUE
MEMBRANAIRE SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE DU COEUR
EMBRYONNAIRE A DIVERS STADES DE L'ONTOGENESE .

I - Action des inhibiteurs sur l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire de 2 jours	134
1. Action de la TTX	134
2. Action des ions Mn^{2+}	134
3. Actions simultanées de la TTX et des ions Mn^{2+}	135
4. Action du TEA	135
5. Action du lanthane	136
II - Action des inhibiteurs sur l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire de 3 jours	136
1. Action de la TTX	136
2. Action des ions Mn^{2+}	137
3. Action du TEA	137
4. Action du lanthane	137
III - Action des inhibiteurs sur l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire de 4 jours	137

1. Action de la TTX	137
2. Action des ions Mn^{2+}	138
3. Action du TEA	138
4. Action du lanthane	138
IV - Action des inhibiteurs sur l'activité électrique ventricu- laire du coeur embryonnaire de 19 jours	139
1. Action de la TTX	139
2. Action des ions Mn^{2+}	139
3. Action du TEA	139
4. Action du lanthane	140
V - Conclusions	140
B - <u>EFFETS DES INHIBITEURS DE PERMEABILITE IONIQUE</u> <u>MEMBRANAIRE SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE DU TISSU</u> <u>MYOCARDIQUE EN CULTURE IN VITRO.</u>	
I - Action des inhibiteurs de perméabilité ionique sur l'activité électrique des fragments ventriculaires en culture <u>in vitro</u>	145
1. Action de la TTX	145
2. Action des ions Mn^{2+}	145
3. Action du TEA	146
4. Action du lanthane	146
II - Action des inhibiteurs de perméabilité ionique sur l'acti- vité électrique du tissu myocardique différencié en culture <u>in vitro</u> à partir du mésoderme précardiaque explanté isolément	146
1. Action de la TTX	146
2. Action des ions Mn^{2+}	147
3. Action du lanthane	147
4. Action du TEA	147

III - Action des inhibiteurs de perméabilité ionique sur l'activité électrique des tubes cardiaques différenciés en culture <u>in vitro</u>	148
1. Action de la TTX	148
2. Action des ions Mn^{2+}	148
IV - Conclusions	149

CINQUIEME PARTIE : EFFETS DES COURANTS IMPOSES TRANS-
=====MEMBRANAIRES AU COURS DE LA DIFFERENCIATION
CARDIAQUE. RELATIONS COURANT-POTENTIEL.

A - <u>EFFETS DES COURANTS IMPOSES TRANSMEMBRANAIRES SUR LE POTENTIEL MEMBRANAIRE DES MYOBLASTES VENTRICULAIRES EMBRYONNAIRES A DIFFERENTS STADES DU DEVELOPPEMENT.</u>	
I - Relations courant - potentiel du ventricule de l'embryon de 2 jours	153
II - Relations courant - potentiel dans le cas du ventricule embryonnaire de 4 jours	154
III - Relations courant - potentiel dans le cas du ventricule embryonnaire de 19 jours	154
B - <u>EFFETS DES COURANTS IMPOSES SUR LE POTENTIEL DE MEMBRANE DES MYOBLASTES DIFFERENCIES EN CULTURE <u>IN VITRO</u></u>	155
C - <u>CONCLUSIONS</u>	155

CONCLUSIONS GENERALES

A - <u>POTENTIALITES DE DIFFERENCIATION DU MESODERME</u>	
<u>PRECARDIAQUE</u>	159
B - <u>ASPECTS PHYSIOLOGIQUES DE LA DIFFERENCIATION</u>	
<u>CARDIAQUE</u>	160
I - Activité électrique du tissu myocardique	160
II - Effets des catécholamines sur le tissu cardiaque embryonnaire	166
III - Présence d'une substance cholinergique dans le tissu myocardique aneural différencié <u>in vitro</u>	167
RESUME	170
BIBLIOGRAPHIE	173

INTRODUCTION

La différenciation cardiaque chez les embryons de Vertébrés et notamment dans le cas des Oiseaux a fait l'objet de nombreuses recherches morphologiques et physiologiques. L'ébauche cardiaque apparaît très tôt au cours de l'ontogenèse et devient rapidement fonctionnelle. Ainsi, chez l'embryon de poulet, le tube cardiaque présente une activité contractile spontanée dès le stade de 9 somites (OLIVO, 1925).

L'étude de l'ultrastructure des cardiomyoblastes en voie de différenciation a permis d'établir la chronologie de la formation des myofibrilles striées (LANZAVECCHIA, 1957; HIBBS, 1959; LINDNER, 1964; OLIVO et coll., 1964). Les myofilaments apparaissent à un stade précoce du développement embryonnaire: ils ont été observés dans les cellules du mésoderme précardiaque de l'embryon de poulet au stade du prolongement céphalique (G. LE DOUARIN, 1965).

Chez les Vertébrés supérieurs, les processus de la détermination embryologique conférant aux cellules cardiaques présomptives la capacité de se différencier en acquérant les structures et les mécanismes fonctionnels des cardiomyoblastes n'ont pu être reconnus de façon précise. Ces processus se produisent en effet aux stades initiaux du développement embryonnaire, ce qui en rend l'analyse expérimentale très délicate. Le caractère précoce de la détermination embryologique du matériel cardiaque présomptif est mis en évidence par le fait que le mésoderme de l'aire cardiaque de l'embryon de poulet peut se différencier en tissu myocardique après avoir été isolé par action de la trypsine des autres feuillets embryonnaires et placé en greffe coelomique ou en culture organotypique in vitro (G. LE DOUARIN, N. LE DOUARIN et CUMINGE, 1965; G. LE DOUARIN, NANOT et RENAUD, 1966; G. LE DOUARIN et RENAUD, 1967; G. LE DOUARIN et RENAUD, 1969).

De plus G. LE DOUARIN et coll. (1965, 1966) ont montré que dans l'aire cardiaque existe une régionalisation précoce des territoires présomptifs sino-

atrial, ventriculaire et bulbaire. Toutefois, dans les conditions de la culture in vitro, la formation de tissu myocardique à partir du mésoderme précardiaque isolé ne s'accompagne pas d'une morphogenèse et d'une histogenèse normales. De plus, dans ces conditions, la différenciation cellulaire des cardiomyoblastes n'atteint, en ce qui concerne l'acquisition des ultrastructures spécifiques, qu'un stade relativement peu évolué (les myofibrilles restent grêles et flexueuses, elles sont disposées dans toutes les directions et non organisées en travées parallèles, le reticulum longitudinal et les tubules transverses ne se constituent pas. Les cellules myocardiques restent de petite taille et de forme irrégulièrement arrondie).

La différenciation des cellules cardiaques embryonnaires a été étudiée par plusieurs auteurs sous l'angle des perméabilités ioniques membranaires assurant l'électrogenèse. Les travaux de BERNARD et GARGOUIL (1963, 1968a, 1970b) et de BERNARD et coll. (1968c, 1969) ont mis en évidence, chez l'embryon de rat, une évolution des perméabilités aux ions Na^+ , Ca^{2+} et K^+ de la membrane des cellules cardiaques au cours de l'ontogenèse. Cette évolution, qui a été mise en évidence par l'utilisation d'inhibiteurs de perméabilités et de déséquilibres ioniques, conduit progressivement la membrane des cardiomyoblastes à acquérir les caractéristiques fonctionnelles observées chez l'adulte. Chez l'embryon de poulet, les données concernant l'évolution des perméabilités ioniques membranaires sont plus fragmentaires.

Au cours du développement embryonnaire du rat, il se produit des modifications de la sensibilité du coeur aux catécholamines qui paraissent être en relation avec l'établissement de l'innervation cardiaque adrénergique (BERNARD et coll., 1967). Dans le cas du coeur embryonnaire de poulet, les résultats obtenus par les auteurs ne sont pas concordants. Il apparaît toutefois que la sensibilité aux catécholamines précède l'établissement de l'innervation cardiaque: au 3ème jour de l'incubation, le coeur est sensible à la noradrénaline (OBRECHT-COUTRIS et CORABOEUF, 1967).

L'existence d'une substance cholinergique endogène dans le myocarde de l'embryon de poulet, avant la formation des nerfs cardiaques, a été mise en évidence et rend compte de l'inhibition post-stimulative qui fait suite à une période d'entraînement électrique de cette préparation aneurale (OBRECHT-COUTRIS, G.

LE DOUARIN et CORABOEUF, 1964; OBRECHT-COUTRIS, CORABOEUF et G. LE DOUARIN, 1966, 1968; CORABOEUF, G. LE DOUARIN et OBRECHT-COUTRIS, 1970a et b), sans qu'il puisse être actuellement précisé si cette substance provient de cellules spécialisées ou de l'ensemble des cellules myocardiques.

Au cours de ce travail, nous avons envisagé successivement divers aspects de la différenciation cardiaque chez l'embryon de poulet.

Nous avons cherché à préciser quelles sont les capacités de différenciation du mésoderme précardiaque cultivé isolément en prenant comme critères les caractéristiques électrophysiologiques des cellules myocardiques présentes dans le tissu formé in vitro. L'influence exercée sur la formation du coeur par les feuilletts endodermique et ectodermique de l'aire cardiaque présomptive a également été étudiée.

Nous avons ensuite étudié de façon comparative la sensibilité aux catécholamines du tissu cardiaque à divers stades du développement embryonnaire normal et dans les conditions de la différenciation in vitro de ce tissu. Dans ce dernier cas, nous avons recherché si des arguments histochimiques et électrophysiologiques permettaient d'envisager l'existence d'une substance cholinergique endogène telle qu'elle a été mise en évidence aux stades anaux du développement cardiaque.

L'étude de l'évolution des perméabilités ioniques membranaires des cellules cardiaques chez le poulet a été effectuée par différentes techniques (déséquilibres ioniques, inhibiteurs de perméabilités, passage de courants transmembranaires). Le but de ce travail a été d'apporter des renseignements sur la nature et la chronologie des changements fonctionnels qui se manifestent au niveau des membranes cellulaires des cardiomyoblastes au cours de la différenciation du coeur chez l'embryon de poulet.

Certains résultats ont fait l'objet de publications: G. LE DOUARIN, NANOT et RENAUD (1966), G. LE DOUARIN et RENAUD (1967), G. LE DOUARIN et RENAUD (1967), RENAUD et G. LE DOUARIN (1968a, 1968b), G. LE DOUARIN et RENAUD (1969), RENAUD et G. LE DOUARIN (1969), RENAUD et G. LE DOUARIN (1970), RENAUD et G. LE DOUARIN (1973).

HISTORIQUE

I. - EMBRYOLOGIE DU COEUR DE POULET.

- 1 - Les potentialités cardiogénétiques du blastoderme.
- 2 - La morphogenèse cardiaque.
- 3 - L'établissement de l'innervation cardio-régulatrice.

II. - ASPECTS CELLULAIRES DE LA DIFFERENCIATION CARDIAQUE.

- 1 - Aspects ultrastructuraux.
- 2 - Aspects immunochimiques.
- 3 - Aspects électrophysiologiques.
- 4 - Sensibilité du coeur embryonnaire aux neurotransmetteurs.

III. - ACTIVITE ELECTRIQUE DES STRUCTURES EXCITABLES.

- 1 - La théorie ionique.
- 2 - Propriétés électriques de la membrane cardiaque.
- 3 - Activité électrique des tissus cardiaques embryonnaires.

IV. - ACTION DE FACTEURS IONIQUES SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE CARDIAQUE.

- 1 - Rôle des ions sodium.
- 2 - Rôle des ions calcium.
- 3 - Rôle des ions potassium.

Le coeur des Vertébrés est le premier organe à se différencier morphologiquement au cours de l'embryogenèse. C'est également le premier à manifester une activité fonctionnelle alors qu'il n'est encore qu'à l'état d'ébauche. Dès 1878, LAVERAN montrait que le coeur était animé de battements spontanés bien avant l'achèvement de sa morphogenèse. L'apparition des premiers battements se situe au stade de 9 à 10 paires de somites chez l'embryon de poulet.

I. - EMBRYOLOGIE DU COEUR DE POULET.

=====

1 - Les potentialités cardiogénétiques du blastoderme.

Depuis longtemps on a cherché à localiser les différents territoires présomptifs, c'est-à-dire à repérer aux stades précoces et en tout cas avant les signes de la différenciation morphologique d'un organe, les régions du blastoderme où sont situées les cellules qui donneront naissance à cet organe.

OLIVO (1928) a montré qu'au stade du blastoderme non incubé les parties périphériques peuvent seules fournir, en culture in vitro, du tissu cardiaque. BUTLER (1935) observe d'autre part que les cellules cardiaques présomptives sont plus abondantes dans la région postérieure que dans les régions latérales et antérieures du blastoderme.

Ainsi, au cours des premières heures de l'incubation, l'aptitude à former du tissu cardiaque, initialement très largement répandue dans le blastoderme, tend à se concentrer dans la région postérieure. Ultérieurement, au stade de la ligne primitive, les potentialités cardiogénétiques se localisent de part et d'autre de cette ligne primitive (RUDNICK, 1938; HUNT, 1932).

Les travaux de WILLIER et RAWLES (1935), de RAWLES (1936 et 1943) ont précisé les limites des territoires cardiaques présomptifs au stade du prolongement céphalique. Ces territoires occupent une position bilatérale de part et d'autre du prolongement céphalique et du tiers antérieur environ de la ligne primitive (Fig. 1). Cette origine bilatérale du coeur a permis à divers auteurs d'obtenir des monstres à coeur double en empêchant expérimentalement la fusion des deux territoires cardiaques présomptifs (WOLFF, 1933; JOLY et LIEURE, 1938) ou par la destruction de l'un des deux territoires, d'obtenir un embryon à "coeur droit" ou à "coeur gauche" (JOLY et LIEURE, 1938; ORTS-LLORCA 1963).

De HAAN (1963) fractionne des aires cardiaques présomptives d'embryons de poulet de stades 4 à 8 de HAMBURGER et HAMILTON (1951) et les cultive in vitro pendant 48

heures. Les résultats obtenus montrent que l'aptitude à former des vésicules contractiles in vitro est d'autant plus précoce que l'explant provient d'une région située plus en arrière dans l'aire cardiaque; les vésicules formées à partir des fragments postérieurs se contractent à un rythme supérieur à celles différenciées par les fragments moyens. Les fragments antérieurs produisent un tissu contractile battant à un rythme très lent.

Donc, dès un stade précoce, l'aire cardiaque paraît posséder des potentialités histogénétiques hétérogènes.

Par l'analyse électrophysiologique du tissu cardiaque formé in vitro selon la méthode de culture de WOLFF et HAFFEN (1952) à partir de fragments définis de l'aire cardiaque présomptive provenant d'embryons aux stades de développement s'échelonnant du repli céphalique transverse à celui de 5 somites, LE DOUARIN G., OBRECHT et CORABOEUF (1965 et 1966) ont pu apporter des preuves de l'existence d'une détermination régionale précoce de l'aire cardiaque. En effet, dans l'aire cardiaque présomptive prélevée en totalité et cultivée in vitro, il se différencie dans l'explant les trois catégories cellulaires du myocarde, c'est-à-dire les cellules atriales, ventriculaires et bulbaires reconnaissables par les caractéristiques de leurs potentiels d'action. La durée des potentiels d'action, ainsi que leurs décours, permettent de voir que la partie antérieure de l'aire cardiaque contient les futures cellules bulbaires, la partiemoyenne les futures cellules ventriculaires et la partie postérieure les futures cellules atriales et sinusales (Fig. 2).

De l'ensemble de ces expériences on peut conclure que la détermination régionale de l'aire cardiaque est un phénomène précoce et que la fragmentation du territoire cardiaque ne donne pas lieu à des régulations.

2 - La morphogenèse cardiaque.

La première indication du coeur embryonnaire s'observe aux stades de 3 à 5 somites (28 heures d'incubation). Elle correspond à un épaississement de la splanchnopleure au niveau des deux vésicules cardio-amniotiques (Fig. 3). Au stade de 7 à 8 somites (33 heures d'incubation), l'ébauche cardiaque encore paire est formée de deux tubes localisés de part et d'autre de l'intestin antérieur. Chaque tube est constitué par un épimyocarde mince (3 à 4 couches de myoblastes) isolé de la gelée cardiaque par un feuillet endocardique constitué par une assise unicellulaire à cellules aplaties (Fig. 4).

Peu après l'achèvement du plancher pharyngien, les deux tubes cardiaques se rapprochent sur la ligne médiane, s'accolent et perdent leur paroi commune.

Au stade de 9 somites (35 heures d'incubation) les premiers battements cardia-

ques apparaissent (BRUNO, 1918; OLIVO, 1924). A cette étape du développement seule l'ébauche bulbo-ventriculaire est différenciée. L'atrium d'une part, le sinus d'autre part ne s'incorporant que plus tardivement à cette ébauche (respectivement à 15 somites et à 25 somites environ). Les premières pulsations n'intéressent tout d'abord que le bord droit de la portion bulbo-ventriculaire de l'ébauche cardiaque (JOHNSTONE, 1925). Cette activité spontanée très localisée à l'origine, envahit rapidement l'ensemble de l'ébauche cardiaque. Les battements tout d'abord irréguliers, se stabilisent ensuite sur un rythme lent. Ces contractions sont d'origine myogène puisqu'à ce stade l'innervation n'est pas établie.

Au stade de 14-16 somites (40 heures d'incubation), la chambre auriculaire, dépourvue de septum, s'incorpore au tube cardiaque (PATTEN et KRAMER, 1933) mais ne présente pas de battements. L'apparition des courbures caractéristiques du coeur embryonnaire se manifeste par l'infléchissement de la partie bulbo-ventriculaire vers la droite (Fig. 5). Ce n'est que vers 16 à 18 somites (48 heures d'incubation) que l'atrium devient fonctionnel (PATTEN, 1922). Le rythme des contractions initialement faible s'accélère, la contraction prenant naissance dans la partie du coeur la plus récemment formée (BARRY, 1942; OBRECHT-COUTRIS, G. LE DOUARIN et CORABOEUF, 1968; OBRECHT-COUTRIS, 1970). Le sinus veineux se différencie beaucoup plus tardivement (vers les stades 20-28 somites : 75 heures d'incubation). A ces stades, le septum atrial se forme et divise la chambre auriculaire en deux oreillettes. Le septum ventriculaire ne divise la partie ventriculaire de la chambre bulbo-ventriculaire qu'au stade de 45 somites environ (4 j. d'incubation), stade contemporain de l'apparition de l'ébauche des membres (HOCHSTETTER, 1906).

3 - L'établissement de l'innervation cardio-régulatrice.

Au début de la différenciation cardiaque, le coeur embryonnaire de différents Vertébrés (poissons, batraciens, fœtus humain) ne possède pas d'innervation. L'innervation du coeur embryonnaire de poulet est encore mal connue, alors que l'innervation du coeur adulte a été bien établie, notamment par SMITH (1971).

Les premiers travaux concernant l'innervation du coeur de l'embryon de poulet ont été réalisés par ABEL (1912) et SZONTROCH (1929). Pour ces auteurs, l'innervation du coeur embryonnaire s'établirait au cours du 5ème jour d'incubation.

SZEPSENWOL et BRON (1936) reprennent ces travaux et montrent que l'innervation cardiaque apparaît bien après l'apparition des premières pulsations. Vers la 68ème heure d'incubation, des fibres issues du ganglion thoracique du nerf vague atteignent la partie distale du tronc artériel au travers de la paroi des arcs aortiques, alors qu'aucun élément sympathique n'est encore présent. D'après ces auteurs, ces fibres vagues seraient

plutôt sensibles que motrices. La terminaison de ces fibres par des boutons en contact direct avec l'endothélium vasculaire rendrait compte davantage de leur rôle sensitif que d'un rôle moteur.

Ce n'est que vers la 84ème heure d'incubation que des éléments sympathiques commencent à accompagner les fibres vagues. Au préalable une anastomose s'est produite entre le ganglion thoracique du vague et le ganglion sympathique cervical supérieur.

ABEL (1912) observe l'existence de fibres vagues associées à des corps cellulaires de fibres sympathiques au voisinage du tronc artériel de l'embryon de 108 à 112 heures d'incubation. Ces éléments nerveux sympathiques et vagues peuvent être mis en évidence dans le septum du tronc aortique du coeur de l'embryon de 5 à 6 jours d'incubation.

La branche du nerf vague se dirige vers la région auriculaire qu'elle atteint au cours du 5ème jour d'incubation. Au cours du 6ème jour d'incubation on trouve au niveau du bulbe et de la paroi atriale des plexus constitués d'éléments sympathiques et parasympathiques. A ce stade du développement embryonnaire l'examen histologique de la paroi myocardique montre des éléments nerveux sympathiques (neurones multipolaires) et parasympathiques (neurones unipolaires et bipolaires).

En 1954, ENIKEEVA à la suite d'études sur l'innervation cardiaque embryonnaire conclut à la non participation de celle-ci dans la cardio-régulation. Cet auteur s'appuie sur le fait que l'arc vagal réflexe ne devient fonctionnel que tardivement après la naissance.

Chez l'embryon de rat, l'innervation cardiaque inexistante à 13 jours post-coïtum est achevée à 16 jours (GOMEZ, 1958). Chez la souris, NANOT, BERMON et G. LE DOUARIN (1973) par les techniques de l'imprégnation argentique et de la fluorescence induite, ont pu détecter l'apparition d'éléments nerveux parasympathiques au niveau du tronc artériel du coeur de l'embryon de souris à partir du 11ème jour de la gestation. Par contre, les éléments sympathiques post-ganglionnaires n'atteignent le coeur que vers le 14ème jour de la gestation.

Ainsi l'automatisme cardiaque apparaît comme une propriété inhérente au myocarde. Le système nerveux végétatif n'est nullement nécessaire à l'initiation de l'activité spontanée et il n'est pas établi avec certitude qu'il exerce un contrôle de l'activité cardiaque pendant la période embryonnaire.

II. - ASPECTS CELLULAIRES DE LA DIFFERENCIATION CARDIAQUE.

=====

Connaissant les délimitations spatiales des aires cardiaques présomptives, il était intéressant de chercher à repérer les futures cellules atriales, ventriculaires et bulbaires dans l'ensemble des cellules cardiaques présomptives.

Si l'on se réfère à la figure 1, on constate que plusieurs aires présomptives ont des limites voisines ou même semblables. Ainsi, les aires présomptives cardiaques et hépatiques se confondent. N. LE DOUARIN (1964) dans un travail sur la différenciation hépatique a montré que le mésoderme précardiaque a un rôle inducteur dans la différenciation hépatique.

1 - Aspects ultrastructuraux.

Aux premiers stades du développement du coeur, la microscopie photonique ne permet pas de distinction entre les cellules précardiaques, les futures cellules du mésoderme hépatique et les cellules mésenchymateuses banales. Ainsi, le mésoderme de l'aire précardiaque n'est pas constitué des seules cellules précardiaques, mais comporte un mélange de cellules mésodermiques indiscernables entre elles.

La microscopie optique n'avait pas permis de mettre en évidence de myofibrilles au stade de 9 somites, c'est-à-dire au début de l'activité contractile spontanée de l'ébauche cardiaque. Ce n'est qu'au stade de 11 somites que OLIVO (1925) a pu observer l'existence de rares myofibrilles. Donc, jusque vers 1930, on admettait que les premiers battements cardiaques répondaient à la théorie de la contraction sarcoplasmique de BOTTAZZI. OLIVO (1932), par l'utilisation du microscope polarisant, observe une biréfringence dans les myoblastes avant que le tube cardiaque ne soit contractile (embryons au stade de 7 somites). Pour cet auteur, cette biréfringence préfigure l'existence d'un matériel contractile encore non structuré.

La microscopie électronique a permis d'apporter de nouvelles précisions sur la myogenèse. De nombreux travaux ont montré que le sarcoplasme des myoblastes et des fibres musculaires en régénération présentait une forte basophilie en rapport avec des concentrations élevées d'acide ribonucléique.

BERGMAN (1962) au cours de la morphogenèse des muscles squelettiques de rat, puis HAY (1963) dans une étude ultrastructurale des muscles caudaux de la salamandre, indiquent la présence de nombreuses particules de ribonucléoprotéines en association étroite avec les myofilaments en voie de formation.

HEUSON-STIENNON (1964) a étudié chez l'embryon de rat le processus de formation des myofilaments. Les ribosomes, tout d'abord éparpillés dans le cytoplasme, se regroupent en petits amas. Un filament ténu d'environ $15 \text{ \AA}$ de diamètre relie les ribosomes entre eux. Puis une des extrémités du filament se détache des ribosomes et son diamètre augmente, atteignant $100 \text{ \AA}$ environ. Au cours des étapes ultérieures, les ribosomes sont toujours en rapport étroit avec les filaments en formation, ce qui souligne le rôle des polysomes dans la synthèse des protéines contractiles.

LANZAVECCHIA (1957), puis LINDNER (1957 et 1960) et HIBBS (1959) ont pu observer de rares myofibrilles striées dans les tubes cardiaques d'embryons à des stades compris entre 9 somites et 35 somites. Les travaux de WAINRACH et SOTELO (1961) ont montré l'existence de myofilaments courts et fins dans les myoblastes cardiaques de poulet au stade de 6 somites, ainsi que des ébauches de disques intercalaires. Déjà un matériel granulaire plus dense aux électrons indique la genèse des futures stries Z. OLIVO, LASCHI et LUCCI (1964), puis OLIVO (1964) ont montré chez l'embryon de poulet que dès le stade de 7 somites, on pouvait observer dans le cytoplasme des futurs myoblastes, des myofilaments onduleux de $50 \text{ \AA}$ de diamètre, qui sont quelquefois rassemblés en faisceaux de 0,5 à $0,6 \mu$ d'épaisseur. Ces myofilaments sont à l'origine des futures myofibrilles striées. Des résultats analogues ont été obtenus par CARAVITA et GIBERTINI (1966) sur ce même matériel. Un travail de PAGER (1968) montre une évolution chronologique analogue dans le développement ultrastructural des myoblastes de fœtus de rat.

En 1965, G. LE DOUARIN a montré que les myofilaments décrits par OLIVO dans les myoblastes d'embryon de poulet au stade de 7 somites apparaissent en fait dès un stade précoce du développement, au stade du prolongement céphalique (Fig. 6). Ce résultat indique que la différenciation cardiaque débute très tôt au cours du développement embryonnaire et progresse jusqu'à l'acquisition des structures et des mécanismes physiologiques liés au fonctionnement de la cellule cardiaque.

Ainsi, dès le stade du prolongement céphalique, un premier signe de la différenciation cardiaque se manifeste par des synthèses de protéines spécifiques dans les futurs myoblastes cardiaques.

Pour G. LE DOUARIN (1965) les myofilaments de $50 \text{ \AA}$ de diamètre correspondent morphologiquement à des filaments d'actine et constituent une étape initiale de la formation des myofibrilles. Donc dès le stade du prolongement céphalique, les cellules du mésoderme précardiaque sont déjà déterminées et ont commencé leur différenciation comme le montre la présence des myofilaments.

2 - Aspects immunochimiques.

EBERT (1950) montre que des substances antigéniques cardiaques existent dans le blastoderme dès le stade du prolongement céphalique. En effet, si le milieu de culture sur lequel est placé le blastoderme contient un sérum anti-coeur, la différenciation du coeur pulsatile de l'embryon est inhibée. En 1955, puis en 1959 ce même auteur a montré l'existence de protéines contractiles actine-myosine ou de protéines ayant un déterminant commun avec l'actine ou la myosine dans les aires cardiaques présomptives de l'embryon au stade du prolongement céphalique. Ces résultats ont été confirmés, sur ce même matériel par la technique du marquage radioactif des anticorps par divers auteurs (HOLTZER, 1959; SZENT-GYORGYI et HOLTZER, 1963).

Ainsi dès un stade précoce du développement, l'ARN messager a pu livrer son information et les structures polyribosomiques synthétisent les myofilaments. Ces myofilaments sont libérés dans le cytoplasme du myoblaste où ils forment un véritable feutrage. Au cours des étapes ultérieures ils s'orienteront parallèlement entre eux pour constituer les myofibrilles striées caractéristiques.

3 - Aspects électrophysiologiques.

Les premiers travaux concernant l'activité électrique globale du coeur embryonnaire de poulet datent de 1913. WERTHEIM-SALOMONSON (1913) fut le premier à enregistrer l'électrogramme global du coeur embryonnaire de poulet de 60 heures d'incubation. La technique utilisée et en particulier le manque d'amplification n'a pas permis à cet auteur de donner une interprétation des tracés. A la suite de ces travaux, CLUZET et SARVONAT (1914), puis KÜLBS (1920), SPADOLINI et GIOGIO (1921) ont montré que l'onde P et le complexe QRST pouvaient être enregistrés sur des coeurs embryonnaires de poulet après 50 à 72 heures d'incubation.

Les perfectionnements techniques ont permis à HOFF, KRAMER, DU BOIS et PATTEN (1939), sur des embryons au stade de 15 somites, de montrer l'analogie entre l'électrogramme du tube cardiaque de ce stade et le coeur adulte.

En 1943, puis en 1948 OLIVO développait ces résultats et, par la technique de culture in vitro en goutte pendante, enregistrait les caractéristiques électriques globales du myocarde embryonnaire de poulet à partir du stade de 9 somites, une heure après le commencement de l'activité contractile. Cette même technique a été utilisée par G. LE DOUARIN (1964). Cet auteur a pu préciser la morphologie de l'électrocardiogramme du coeur au 4^{ème} jour d'incubation placé en culture organotypique et étudier les perturbations des tracés électrocardiographiques à la suite de l'irradiation aux rayons X de l'organe (Fig. 7).

Si l'activité électrique globale du coeur embryonnaire a été connue très tôt, il a fallu attendre les années 1952 et suivantes pour obtenir les premiers résultats de l'activité électrique transmembranaire du coeur embryonnaire de poulet. Les améliorations de la technique de fabrication des microélectrodes et des circuits d'enregistrement ont permis la réalisation des premiers enregistrements transmembranaires de l'activité électrique cardiaque par CORABOEUF et WEIDMANN (1949) sur le tissu conducteur de chien. La présence d'une inversion de potentiel de l'ordre de 40 mV au cours du potentiel d'action 'mettait le tissu cardiaque au même rang que les tissus nerveux ou musculaire squelettiques déjà étudiés" (CORABOEUF, 1960).

Les premiers travaux électrophysiologiques concernant le coeur embryonnaire de poulet sont dus à FINGL, WOODBURY et HECHT (1952). Ces auteurs s'intéressent surtout à l'influence de l'innervation sur le décours de l'activité électrique auriculaire et ventriculaire. Quel que soit l'âge de l'embryon, ils n'observent pas de différence entre la morphologie de l'activité électrique embryonnaire et celle de l'adulte et concluent que le myocarde même non innervé (avant 4 jours et demi d'incubation) présente une maturité précoce.

L'abondance de la bibliographie sur ce sujet nous oblige à nous limiter pour nous intéresser, dans l'immédiat, aux critères de la différenciation cellulaire cardiaque précoce.

La figure 8 met en évidence des différences dans le décours des potentiels d'action selon la région anatomique d'où ils émanent. Les potentiels d'action sino-atriaux et auriculaires sont dépourvus de plateau. Les potentiels d'action sino-atriaux présentent une diastole électrique instable, c'est-à-dire une pente de dépolarisation diastolique qui signe le caractère automatique de ces cellules. Les potentiels d'action des régions ventriculaires et bulbaires présentent un plateau de repolarisation qui confère à ces potentiels d'action une durée supérieure aux potentiels atriaux. Dans ces deux types de potentiels, la diastole est parfaitement isoélectrique.

Nous avons noté précédemment que dans l'aire cardiaque présomptive au stade du prolongement céphalique prélevée en totalité et placée en culture in vitro (LE DOUARIN G., OBRECHT et CORABOEUF, 1965 et 1966) il était possible de distinguer dans l'explant les trois types de potentiels d'action: potentiels atrial, ventriculaire et bulbaire (Fig. 2). Chacun de ces fragments de l'aire cardiaque présomptive explantés in vitro forment des vésicules contractiles. Le rythme des battements et surtout les caractéristiques de l'activité électrique intracellulaire diffèrent selon le niveau de l'aire cardiaque auquel le fragment a été prélevé. Alors que les fragments antérieurs présentent des potentiels d'action de type bulbaire, les fragments moyens de type ventriculaire, les fragments postérieurs manifestent une activité électrique cellulaire de type atrial.

Ces résultats montrent qu'avant toute différenciation morphologique, les critères électrophysiologiques permettent de préciser que l'aire précardiaque, dès le stade du prolongement céphalique n'est pas homogène. La ségrégation de ces différents territoires montrent la précocité de la détermination cellulaire. D'autre part, cette détermination est rigoureuse puisqu'il ne se produit pas de régulation dans chacun des fragments isolés expérimentalement.

Ainsi, les potentialités histogénétiques cardiaques très largement répandues au stade du blastoderme non incubé se condensent dans la région postérieure dès les premières heures d'incubation. Après 12 heures environ d'incubation, les aires cardiaques présomptives bilatérales sont nettement délimitées et les cellules mésodermiques destinées à former les futurs myoblastes sont déterminées. En outre, chacune des catégories cellulaires entrant dans la constitution des différents étages du coeur sont groupées et occupent une région nettement délimitée de l'aire cardiaque présomptive.

4 - Sensibilité du coeur embryonnaire aux neurotransmetteurs.

A. - Effets des substances adrénergiques.

Les modifications de l'activité électrique des tissus cardiaques adultes sont bien connues sous l'effet de la stimulation sympathique ou de l'administration d'adrénaline.

En règle générale, l'adrénaline a des effets chronotropes et inotropes positifs sur les battements cardiaques. L'adrénaline accélère la dépolarisation diastolique et la vitesse de la phase ascendante du potentiel d'action du sinus veineux de grenouille (HUTTER et TRAUTWEIN, 1956). Ces phénomènes s'accompagnent d'une diminution du seuil d'excitation (WEST, FALK et CERVONI, 1956). Sur des préparations silencieuses de tissu conducteur de mouton, l'adrénaline est capable de déclencher une activité automatique (OTSUKA, 1958).

Les effets de l'adrénaline sur le coeur embryonnaire ont été étudiés par de nombreux auteurs en relation avec le stade de l'établissement de l'innervation cardiaque. Les conclusions auxquelles aboutissent les auteurs ne sont pas concordantes.

MATSUMORI (1929) et BARRY (1950) observent sur des coeurs embryonnaires de poulet de 29 heures et 40 heures d'incubation, une augmentation de la fréquence des battements cardiaques après une administration d'adrénaline.

GUELIN-SCHEDRINA (1936) en injectant de l'adrénaline dans la veine omphalo-mésentérique de l'embryon de poulet de 48 heures d'incubation a observé une accélération transitoire des battements cardiaques suivie d'un ralentissement.

FUJII (1927), au contraire, n'obtient aucune action de l'adrénaline sur le coeur embryonnaire avant la fin du 4ème jour d'incubation, c'est-à-dire au moment où s'établit l'innervation cardiaque.

En 1952, FINGL, WOODBURY et HECHT notent l'apparition d'un effet chronotrope positif marqué après administration d'une solution d'adrénaline à la concentration de 10^{-6} g/ml quel que soit l'âge de l'embryon de poulet. De même, MAC CARTY, LEE et SHIDEMAN (1960) en comparant les effets de l'adrénaline et de la noradrénaline sur le coeur de l'embryon de poulet de 4 à 8 jours d'incubation, obtiennent un effet chronotrope positif après administration de l'une ou de l'autre de ces drogues. Cette accélération du rythme est supprimée par un traitement préalable au dichloroisoprotérénol (D.I.C.), inhibiteur des β récepteurs adrénergiques.

OBRECHT-COUTRIS et CORABOEUF (1967) ont étudié les effets de la noradrénaline sur l'automatisme du myocarde embryonnaire de poulet avant et après l'élaboration du système nerveux intracardiaque. Les coeurs sont placés sur le milieu gélosé de WOLFF et HAFFEN (1952). Les coeurs d'embryons de 6 jours d'incubation soumis à des concentrations de noradrénaline s'échelonnant de 10^{-12} à 10^{-3} présentent une augmentation de la fréquence des battements. Par contre, la fréquence des battements des coeurs d'embryons de 2 et 3 jours d'incubation (non encore innervés) n'est augmentée qu'à partir d'une concentration de 10^{-7} . L'application préalable d'un inhibiteur β (butidrine Simes) supprime totalement l'effet chronotrope induit par la noradrénaline.

Selon ces observations, le myocarde innervé d'embryon de poulet semble plus sensible aux catécholamines que le myocarde aneural. G. LE DOUARIN et RENAUD (1969), RENAUD et G. LE DOUARIN (1970) ont fait agir de l'adrénaline sur des cultures en milieu liquide de mésoderme précardiaque d'embryons de poulets et de cailles différencié en tissu myocardique pulsatile. L'administration d'adrénaline à ce tissu aneural se traduit par un effet chronotrope positif d'environ 22 % du rythme initial.

Cependant, SPERELAKIS et LEHMKÜL (1965) en administrant à des cellules isolées de coeur d'embryon de poulet de 7 et 8 jours d'incubation de l'adrénaline à une concentration de 10^{-4} g/ml ne décèlent aucune modification du rythme des contractions. KAUFMANN, TRITTHART, RODENROTH et ROST (1969) notent sur des coeurs entiers d'embryons de poulet de 8 à 9 jours d'incubation les effets caractéristiques (inotropes et chronotropes) dus à l'administration d'adrénaline ou de noradrénaline. Par contre, à la différence des coeurs intacts in situ, les cellules myocardiques isolées à partir de coeurs d'embryons de poulet de 8 à 9 jours d'incubation sont insensibles aux catécholamines. Ces auteurs interprètent cette insensibilité par une éventuelle inactivation ou digestion des β récepteurs membranaires spécifiques.

Chez l'embryon de rat, HALL (1954) a pu mettre en évidence une sensibilité précoce (11ème jour post-coïtum) du tissu myocardique à l'adrénaline. BERNARD et GARGOUÏL (1967a) et BERNARD, PAGER et GARGOUÏL (1967b) reprennent cette étude en comparant les effets de l'adrénaline et de la noradrénaline sur le coeur de fœtus de rat. Ces auteurs montrent qu'il y a une évolution dans la sensibilité aux catécholamines en fonction de l'âge de l'embryon. Le myocarde jeune, jusqu'à 16 jours et demi post-coïtum est insensible à l'adrénaline alors qu'il est sensible à la noradrénaline. A 13 jours post-coïtum, la noradrénaline à la concentration de 10^{-6} g/ml produit un effet chronotrope positif. Cet effet est moins marqué à 16 jours et annulé à 19 jours post-coïtum. L'adrénaline au contraire est inefficace avant 16 jours et demi. A ce stade elle provoque un léger effet chronotrope positif qui augmente avec l'âge de l'embryon. A 21 jours post-coïtum l'adrénaline administrée à la concentration de 10^{-6} g/ml, entraîne une accélération de 20 % par rapport au rythme initial. Le potentiel d'action est notablement augmenté en durée par allongement de la phase de repolarisation. Le coeur embryonnaire de rat semble donc, comme le coeur de l'embryon de poulet sensible aux amines biogènes avant que ne s'établisse l'innervation puisque, selon GOMEZ (1958), l'innervation cardiaque chez l'embryon de rat s'établirait entre le 13ème et le 16ème jour post-coïtum.

A cet égard, les travaux de IGNARRO et SHIDEMAN (1968) concernant l'apparition de noradrénaline et d'adrénaline dans le coeur embryonnaire de poulet au cours du développement sont en faveur de l'indépendance entre l'innervation d'une part et l'apparition de ces catécholamines d'autre part. Dans le coeur embryonnaire de 72 heures, donc bien avant l'établissement de l'innervation, ces auteurs détectent en faible quantité de la noradrénaline et de l'adrénaline.

Chez l'embryon de rat, PAGER (1968) signale l'existence d'inclusions osmiophiles dans les cellules myocardiques d'embryons de 14 jours post-coïtum. Ces granules denses présentent une certaine analogie morphologique et structurale avec les inclusions de catécholamines trouvées dans la médullo-surrénale. Des granulations osmiophiles semblables ont été observées par COUTEAUX et LAURENT (1957) dans le muscle atrial d'anguille. PALADE (1961) observe une dégranulation des cellules myocardiques auriculaires après traitement à la résérpine du tissu atrial de rat. Cet auteur suggère que ces granules pourraient bien être des lieux de stockage de catécholamines. Selon JAMIESON et PALADE (1964) ces granules fortement osmiophiles observés dans les cellules atriales de rat seraient élaborés dans le complexe golgien atrial. L'administration de résérpine provoquant une importante dégranulation cellulaire confirme l'analogie de ces granules avec les inclusions de catécholamines médullosurréna-liennes.

Chez l'embryon de souris, NANOT et G. LE DOUARIN (1971) et NANOT (1971) ont mis en évidence l'existence de granules osmiophiles denses dans les cellules myocardiques

dès le stade de 9 jours post-coïtum. Aux stades précoces du développement (de 9 à 13 jours post-coïtum) ces granules osmiophiles sont décelables surtout dans les cellules auriculaires mais présents également dans les cellules ventriculaires. Ces granules sont situés au voisinage des zones golgiennes. A 18 jours post-coïtum, ces granules ne sont détectables qu'au niveau des oreillettes et sont particulièrement nombreux dans l'oreillette droite.

Le traitement par l'adrénaline ou la noradrénaline de fragments de coeur de foetus de 9 jours ne permet pas d'observer une augmentation des granulations dans le tissu myocardique. Par contre, à 13 jours post-coïtum, seule l'administration de noradrénaline provoque une augmentation du nombre des granules tant au niveau auriculaire qu'au niveau ventriculaire. L'adrénaline à la concentration de 10^{-4} g/ml ou de noradrénaline à 10^{-3} g/ml administrées à des fragments de coeurs de foetus de 18 jours produisent une augmentation du contenu cellulaire en granules au niveau des oreillettes et particulièrement de l'oreillette droite. L'innervation du coeur d'embryon de souris s'établissant à partir du 12ème jour post-coïtum, on peut penser avec IGNARRO et SHIDEMAN (1968) que l'innervation intervient dans le stockage des catécholamines.

L'administration de réserpine à la concentration de 10^{-2} g/ml vide partiellement les granules de leur contenu, les rendant moins denses aux électrons.

L'existence de granules osmiophiles dans les coeurs d'embryons de souris et de rats rappelle les structures granuleuses trouvées dans les cellules chromaffines du coeur des cyclostomes. Tous les auteurs (HOFFMEISTER et coll., 1961; BLOOM et coll., 1961, 1962, 1963; CARAVITA et COSCIA, 1966; LEAK, 1969) s'accordent à penser que ces granules sont très proches de par les caractéristiques biochimiques, des granules surrénaliens. Des observations analogues ont été réalisées par G. LE DOUARIN et LIGNON (1971) sur le coeur de l'ammoctète de Lampetra planeri. Sur ce coeur non innervé, l'administration de catécholamines ne produit pas d'effet chronotrope important (LIGNON et G. LE DOUARIN, 1971). Un traitement préalable à la réserpine renforce les effets des amines biogènes (BLOOM et coll., 1971). La relative insensibilité à l'adrénaline et à la noradrénaline du coeur des cyclostomes est attribuée à la présence dans cet organe d'une teneur élevée en catécholamines (BLOOM, 1961, 1963).

Les effets des catécholamines sur le coeur embryonnaire avant le stade de l'innervation du myocarde apparaissent encore imprécis. Quant aux récepteurs membranaires et au stockage de ces amines biogènes le problème est encore très controversé. Si l'existence de récepteurs β adrénergiques est soutenable, il n'en est pas de même des récepteurs α dont l'existence n'a pu être démontrée.

B. - Effets des substances cholinergiques.

De nombreux auteurs ont étudié la sensibilité du myocarde à l'acétylcholine et les résultats obtenus sont souvent contradictoires.

LOEWI (1921) a montré que l'acétylcholine administrée à un coeur de grenouille inhibait ses contractions.

En comparant les effets obtenus sur les contractions cardiaques avant, puis après l'innervation de cet organe, ARMSTRONG (1935), GARREY (1937), GARREY et CHASTAIN (1937), PROSSER (1942) ont conclu sur l'importance de l'établissement de l'innervation cholinergique dans la sensibilité à l'acétylcholine. HOFFMAN et SÜCKLING (1953) n'observent aucune modification de l'activité électrique du ventricule de chien sous l'action de l'acétylcholine. Cette insensibilité serait due à l'absence d'innervation cholinergique de la région interrogée. De même, ÖSTLUND (1954), puis FÄNGE et ÖSTLUND (1954) n'observent aucun effet de l'acétylcholine sur le coeur de myxine. Cette insensibilité à cette substance a été expliquée par l'absence d'innervation de ce coeur (AUGUSTINSSON et coll., 1956; BLOOM et coll., 1962). Chez l'ammocète de Lampetra planeri, LIGNON et G. LE DOUARIN (1971) ont observé que l'administration d'acétylcholine à ce coeur produit des effets chronotropes positifs que ces auteurs interprètent comme étant le résultat d'une libération de catécholamines par les cellules chromaffines de cet organe. L'effet chronotrope positif du type "décharge" croît avec la concentration d'acétylcholine jusqu'à une limite supérieure atteinte pour une concentration de 10^{-5} g/ml.

Si l'innervation cholinergique conditionne la sensibilité du coeur à l'acétylcholine, le coeur embryonnaire non innervé doit être insensible à cette substance.

ARMSTRONG (1935) par injection d'acétylcholine à l'embryon de vairon ne constate aucune modification dans le rythme des contractions cardiaques, alors qu'elles sont supprimées pour de faibles concentrations de cette substance après l'établissement de l'innervation. GARREY et TOWNSEND (1948) font une constatation analogue sur le coeur de fœtus humain. De même GARREY (1937) sur des cultures de cellules cardiaques de poulet avait observé l'inefficacité de l'acétylcholine et concluait, en généralisant cette observation, que l'absence d'innervation cholinergique rendait insensible les muscles à l'action de l'acétylcholine.

Plus récemment, SPERELAKIS et LEHMKÜHL (1965), par la technique microélectrophysiologique, montrent que les cellules isolées à partir du myocarde embryonnaire de poulet de 9 jours d'incubation ne sont pas affectées par deux administrations successives d'acétylcholine à la concentration de 6×10^{-5} g/ml. L'absence d'innervation d'une telle préparation est mise en rapport avec l'inefficacité de l'acétylcholine.

Sur le coeur embryonnaire de rat, HALL (1957) montre que l'acétylcholine produit des effets chronotropes négatifs un peu avant l'innervation. Les travaux de PAGER, BERNARD et GARGOUIL (1965) ne confirment pas ceux de HALL. Ce n'est qu'à partir du 16ème jour post-coïtum que l'acétylcholine modifie les activités électriques et mécaniques cardiaques.

Cependant la plupart des travaux concernant l'embryon de poulet sont en faveur d'une sensibilité précoce du coeur aneural. PLATTNER et HOU (1931) mettent en évidence une sensibilité du coeur embryonnaire de 4 jours d'incubation. BURNIER (1935), en administrant de fortes doses d'acétylcholine (10^{-2} g/ml et 10^{-3} g/ml) obtient sur le coeur d'embryon de poulet de 48 heures d'incubation des effets chronotropes négatifs conduisant même à l'arrêt cardiaque en diastole.

FINGL, WOODBURY et HECHT (1952) montrent que des coeurs d'embryon de poulet de 3 à 7 jours d'incubation sont sensibles à l'acétylcholine à la concentration de 10^{-5} g/ml. L'activité électrique est le plus souvent supprimée quel que soit l'âge de l'embryon. Pour ces auteurs, la sensibilité à cette drogue n'est donc pas en relation avec l'innervation cardiaque. ZINGONI (1956) précise les effets de l'acétylcholine sur des coeurs embryonnaires de poulet de 68 à 70 heures d'incubation. Cet auteur a pu montrer que les effets chronotropes dus à cette substance pouvaient être opposés; certains coeurs voient le rythme de leurs contractions s'accélérer, d'autres à l'inverse se ralentir. De la même façon, un effet nicotinique est observé après l'administration de très faibles doses, alors qu'un effet muscarinique se manifeste pour des doses d'acétylcholine plus élevées.

Ces résultats montrent que le myocarde embryonnaire de poulet serait sensible à l'acétylcholine bien avant l'établissement de l'innervation cardiaque. JONES (1958) confirme ces résultats. Cet auteur empêche le développement de l'innervation parasympathique par ablation du post-cerebrum pratiquée chez des embryons après 40 à 45 heures d'incubation. Les coeurs de ces embryons présentent une sensibilité à l'acétylcholine tout à fait comparable à celle observée sur le myocarde d'embryons non opérés.

OBRECHT-COUTRIS et CORABOEUF (1967) ont étudié les effets chronotropes de l'acétylcholine sur l'automatisme du myocarde embryonnaire de poulet avant et après l'élaboration du système nerveux intracardiaque en prélevant soit le coeur entier, soit des fragments ventriculaires sur des embryons de poulet de 2, 3 et 6 jours d'incubation. Sous l'action de l'acétylcholine, les coeurs âgés présentent un ralentissement marqué et durable de leur fréquence pour les concentrations égales ou supérieures à 10^{-5} g/ml, alors que les coeurs de 2 et 3 jours ne sont sensibles qu'aux concentrations supérieures ou égales à 10^{-4} g/ml. A la concentration de 10^{-4} g/ml, on observe soit un ralentissement initial suivi d'une accélération, soit une augmentation immédiate de fréquence. Pour la concentration de 10^{-3} g/ml, le ralentisse-

ment est toujours très marqué. Les effets chronotropes négatifs de l'acétylcholine sont potentialisés par l'ésérine et sont inhibés par l'atropine, alors que les effets chronotropes positifs ne sont pas modifiés par un prétraitement des préparations par l'inhibiteur β . Le renforcement par l'ésérine des effets inhibiteurs de l'acétylcholine indique, dès un stade précoce et avant l'innervation cardiaque, l'existence d'une activité cholinestérasique cardiaque.

SIPPEL (1954 et 1955), dans les coeurs de salamandre et de rat, ZACKS (1954) sur le coeur embryonnaire de poulet, observent l'existence d'une activité cholinestérasique bien avant l'envahissement du tissu myocardique par le tissu nerveux (à 68 heures d'incubation, soit un jour et demi avant l'innervation). Les cholinestérases commencent à s'accumuler dans le coeur dès les premières contractions et atteignent avant l'innervation le tiers de leur valeur maximale. CREPIN et G. LE DOUARIN (1966) étudient le développement de l'activité cholinestérasique par la méthode histochimique de GEREBTZOFF dans le tissu cardiaque différencié en culture in vitro à partir du mésoderme des aires cardiaques présomptives. Ces auteurs montrent que l'activité spontanée du tissu myocardique différencié en absence de tout élément nerveux s'accompagne de l'apparition de l'activité enzymatique cholinestérasique. Ce résultat a pu être confirmé sur ce même matériel en utilisant une technique de culture différente (RENAUD, 1969). L'existence de cholinestérase dans du tissu myocardique aneural indiquerait son rôle dans le contrôle intrinsèque de la formation d'acétylcholine endogène jusqu'au moment où s'établit le contrôle vagal.

L'existence d'une activité cholinestérasique est donc bien établie dans le cas du coeur aneural. Dans ces conditions peut-on admettre conjointement l'existence du substrat, c'est-à-dire de l'acétylcholine ?

OBRECHT-COUTRIS, CORABOEUF et G. LE DOUARIN (1966, 1968) par une étude électrophysiologique et pharmacologique des effets de l'entraînement électrique ont mis en évidence la libération par le coeur non innervé de jeunes embryons de poulet (3 jours d'incubation) d'une substance endogène apparentée à l'acétylcholine. CORABOEUF, G. LE DOUARIN et OBRECHT-COUTRIS (1970 a et b) ont montré par l'utilisation d'un test biologique de dosage de l'acétylcholine (tension du muscle dorsal ésériné de sangsue) l'existence d'acétylcholine endogène dans le coeur non encore innervé de l'embryon de poulet. D'après ces auteurs cette acétylcholine endogène intracellulaire pourrait être mise en réserve dans des structures particulières: les corps multivésiculaires. Les vésicules qu'ils renferment, par leur analogie avec les vésicules observables au niveau des terminaisons nerveuses, laissent supposer qu'il s'agit peut-être du support ultrastructural à cette acétylcholine endogène. Des structures analogues ont été observées par NANOT et G. LE DOUARIN (1971-b) dans le tube cardiaque du fœtus de souris



à 9 jours post-coïtum et dans le myocarde aneural différencié in vitro à partir du mésoderme précardiaque de l'embryon de souris de 1 à 2 somites.

L'apparition de l'activité spontanée du tissu myocardique étant liée à la présence de sites cholinestérasiques (CREPIN et G. LE DOUARIN, 1966) souligne l'importance de l'acétylcholine dans l'activité du coeur embryonnaire avant le stade de l'établissement de l'innervation cardiorégulatrice.

III. - ACTIVITE ELECTRIQUE DES STRUCTURES EXCITABLES.

=====

On sait que les cellules excitables sont le siège de phénomènes électriques apparaissant de part et d'autre de leur membrane (BERNSTEIN, 1912). D'après WEIDMANN (1956) et CORABOEUF (1960), dès 1873 ENGELMANN, NUEL et PEKELHARING "mesurèrent des potentiels de repos de grande amplitude sur le ventricule de grenouille et signalèrent l'apparition d'un potentiel de sens inverse pendant l'activité".

Sur ce même matériel BURDON, SANDERSON et PAGE (1880, 1883) établissent expérimentalement la conception d'une négativité durable, contemporaine de l'activité cardiaque, qui envahit brusquement le coeur pour le quitter plus lentement.

CURTIS et COLE (1940 et 1942); HODGKIN et HUXLEY (1945); HODGKIN, HUXLEY et KATZ, 1952) mesurent la différence de potentiel existant entre les deux faces de la membrane d'une fibre géante de calmar à l'aide d'une électrode introduite longitudinalement dans la fibre. Ces auteurs décrivent les propriétés électriques de la membrane et donnent le décours du potentiel d'action. A partir de ces observations s'est édifiée une théorie ionique du potentiel membranaire de repos (P.M.R.) et de la genèse du potentiel d'action (P.A.).

1 - La théorie ionique.

A. - Le potentiel membranaire de repos.

Dans la plupart des tissus excitables, la valeur E_m du potentiel membranaire de repos est une fonction du rapport de deux perméabilités, l'une pour le potassium, l'autre pour le sodium. On sait que les différents ions et plus particulièrement le sodium et le potassium ne sont pas aux mêmes concentrations de part et d'autre de la membrane cellulaire, c'est-à-dire entre l'intérieur et l'extérieur des cellules. On admet que le potassium est dans un rapport de concentrations de 1 à 30 entre le milieu extérieur et le milieu intracellulaire. Le sodium est au contraire 10 fois plus concentré environ dans le milieu extracellulaire que dans le milieu intracellulaire. Ces rapports de concentrations pour ces deux ions évoluent au cours du développement embryonnaire (KLEIN, 1960; LANGER, 1970; THURESON-KLEIN et KLEIN, 1971). Au début du développement embryonnaire la concentration sodique interne des myoblastes cardia-

ques est élevée (600 mM). Elle diminue très rapidement pour atteindre une valeur de 50 mM à 10 jours d'incubation, puis de 30 mM au moment de l'éclosion. La concentration sodique du milieu extracellulaire varie dans des proportions moindres, passant de 100 à 135 mM. Le potassium subit au cours du développement cardiaque des fluctuations moins amples. Sa concentration interne de 65 mM chez un coeur d'embryon de 2 jours d'incubation atteint 85 mM à 12 jours pour se stabiliser à 75 mM un peu avant l'éclosion. La concentration extracellulaire de cet ion varie dans des proportions plus faibles (entre 10 et 5 mM). Si la membrane cellulaire est perméable à l'un de ces ions, une différence de potentiel apparaît entre les compartiments intra- et extracellulaire du fait de l'existence d'une pile de concentration. En supposant qu'une membrane ne soit perméable qu'à un ion, le potentiel membranaire a pour valeur le potentiel d'équilibre pour cet ion donné par la formule de Nernst. Si l'on admet avec BERNSTEIN (1902) que la membrane au repos est perméable au potassium sans l'être aux autres ions, l'équation de Nernst s'écrit :

$$E_m = E_{K^+} = \frac{RT}{F} \text{ Log } \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i} \quad \text{où}$$

E_m = potentiel membranaire de repos
 E_{K^+} = potentiel d'équilibre pour l'ion K^+
 R = constante des gaz parfaits
 T = température absolue
 F = valeur de Faraday
 $[K^+]_e$ = concentration extracellulaire de l'ion K^+
 $[K^+]_i$ = concentration intracellulaire de l'ion K^+ .

Cette équation, établie dans le cas de la fibre nerveuse, permet de trouver 91,5 mV pour la valeur de la pile au potassium. Cette valeur théorique est très supérieure à celle enregistrée expérimentalement.

Ainsi, l'hypothèse de BERNSTEIN selon laquelle l'ion potassium était le seul ion pour lequel la membrane était perméable au repos a été complétée par BOYLE et CONWAY (1951). Ces auteurs ont pu montrer, au moins dans le cas de la fibre musculaire striée, que la membrane était également perméable aux ions Cl^- et imperméable aux autres anions et à Na^+ . Cependant l'utilisation des traceurs radioactifs appliquée aux modifications ioniques cellulaires (HARRIS et BURN, 1948 et 1949; KEYNES, 1951) a montré qu'au repos la membrane des cellules excitables n'était pas absolument imperméable aux ions sodium.

En tenant compte de l'ensemble de ces données où, dans le calcul de la valeur du potentiel membranaire de repos interviennent au moins trois ions différents, GOLDMAN (1943), HODGKIN et KATZ (1949), proposent l'équation du champ constant formulée de la façon suivante :

$$E_m = \frac{RT}{F} \log \frac{P_{K^+} [K^+]_i + P_{Na^+} [Na^+]_i + P_{Cl^-} [Cl^-]_e}{P_{K^+} [K^+]_e + P_{Na^+} [Na^+]_e + P_{Cl^-} [Cl^-]_i}$$

où P_{K^+} , P_{Na^+} et P_{Cl^-} désignent la perméabilité aux ions K^+ , Na^+ et Cl^- .

En fait, les coefficients de perméabilité pour les ions Na^+ et Cl^- sont faibles.

Dans le cas de la membrane de la fibre de l'axone géant de Seiche, CURTIS et COLE (1942) attribuant à P_{K^+} le coefficient 1 évaluent P_{Na^+} et P_{Cl^-} à des valeurs inférieures à 0,05.

Malgré l'existence de faibles perméabilités aux ions Na^+ et Cl^- , on peut considérer que le potentiel membranaire de repos se comporte comme une pile de concentration au potassium. Cette approximation est en accord avec les résultats expérimentaux obtenus par divers auteurs (HUXLEY et STÄMPFLI, 1951; HODGKIN et KEYNES, 1955 a et b; WEIDMANN, 1956; CONWAY, 1957). Si l'on augmente la concentration extracellulaire potassique, la valeur du potentiel de membrane devient voisine de celle du potentiel d'équilibre pour l'ion potassium.

L'équation du champ constant montre que pour que le potentiel membranaire reste stable il faut un mouvement constant d'ions, notamment que des ions K^+ puissent pénétrer à l'intérieur de la cellule, alors que des ions Na^+ doivent en sortir. Or de tels transferts ont lieu contre des gradients de concentration. On sait que des préparations isolées maintenues en survie dans des liquides physiologiques perdent lentement du potassium et gagnent au contraire du sodium. In situ une telle situation n'existe pas et, pour comprendre ce mécanisme de compensation des flux de diffusion des ions, il faut faire intervenir un phénomène actif dépendant du métabolisme, appelé par HODGKIN (1957) la "pompe à sodium", laquelle puise son énergie dans le métabolisme. L'emploi d'inhibiteurs métaboliques tels que le dinitrophénol ou le cyanure a permis à de nombreux auteurs de mettre en évidence une diminution de la perte sodique tant au niveau de la membrane nerveuse des céphalopodes (HODGKIN et KEYNES, 1955) qu'au niveau de la membrane des muscles squelettiques de grenouille (EDWARDS et HARRIS, 1957) et cardiaque (SCHREIBER, 1956).

Ainsi, au repos, le flux net d'ions au travers de la membrane est nul et la valeur du potentiel membranaire dépend surtout des perméabilités relatives entre les ions Na^+ et K^+ . Au repos, E_m est voisin du potentiel d'équilibre au potassium puisque le rapport P_{Na^+}/P_{K^+} est faible. Ce rapport peut augmenter soit par une augmentation de P_{Na^+} , soit par une diminution de P_{K^+} , soit par une variation simultanée en sens opposés des deux perméabilités. Lorsque ce rapport P_{Na^+}/P_{K^+} est très grand, la valeur de E_m tend vers le potentiel d'équilibre au sodium. Cette variation rapide et transitoire de la valeur de E_m initialement proche de E_K à la valeur de E_m voisine de E_{Na} constitue la phase ascendante (annulation du P.R et inversion de potentiel ou "overshoot") du potentiel d'action.

B. - Le potentiel d'action (P.A.).

Les premiers enregistrements intracellulaires du potentiel d'action cardiaque sont dus à CORABOEUF et WEIDMANN (1949) sur le tissu de Purkinje du chien. L'enregistrement des P.A. ventriculaires date de 1950. Depuis cette date, les travaux consacrés à cette étude sont multiples; sans être complets, nous citerons ceux de WOODBURY et HECHT (1950) sur le ventricule de grenouille, ainsi que TRAUTWEIN et coll. (1952), LUTTGAW et NIEDERGERKE (1958), sur le coeur de tortue, WEIDMANN (1956), sur le ventricule de roussette par GARGOUÏL et CORABOEUF (1957), sur le ventricule de l'embryon de poulet par FINGL, WOODBURY et HECHT (1952), sur le ventricule de poulet et de pigeon par CORABOEUF, GARNIER, BLET et GARGOUÏL (1960), sur le ventricule de cobaye par CORABOEUF et OTSUKA (1958), CORABOEUF, KAYSER et GARGOUÏL (1956 a), CORABOEUF, GARGOUÏL, LAPLAUD et DESPLACES (1956), sur le ventricule de rat par CORABOEUF, KAYSER et GARGOUÏL (1956 b), GARGOUÏL, CORABOEUF, THIBAUT, HESSE, WALLON et STRUDEL (1958), GARGOUÏL, TRICOCHÉ et BERNARD (1963), BERNARD et GARGOUÏL (1963) sur le ventricule de pangolin par KREHER, WALDEN et TRICOCHÉ (1971 a et b), par WALDEN (1971) sur le singe, etc...

Les potentiels d'actions cardiaques diffèrent de ceux du tissu nerveux ou musculaire squelettique en ce que leur phase de dépolarisation rapide est suivie d'un plateau qui leur confère une durée importante variant de 120 à 500 ms.

La morphologie du P.A. peut être très différente d'une espèce zoologique à une autre, comme le montre schématiquement la figure 9.

Cependant le décours temporel du P.A. est spécifique du tissu interrogé pour un coeur donné (tissu ventriculaire, tissu auriculaire, tissu nodal) comme ont pu le montrer CORABOEUF, DISTEL et BOISTEL (1955), GARGOUÏL (1958), CORABOEUF (1960), TRICOCHÉ (1967), FABIATO (1970).

D'autre part, pour une espèce donnée, on observe une évolution ontogénétique du décours du potentiel d'action au cours du développement embryonnaire. Ainsi l'activité électrique ventriculaire du rat embryonnaire est différente de celle du rat adulte tant dans sa morphologie du P.A. que dans sa durée (BERNARD et GARGOUÏL, 1963). De même, l'activité électrique des myoblastes ventriculaires d'axolotl et d'amblystome est modifiée par la métamorphose comme l'ont montré TRICOCHÉ et coll. (1961).

Bien que la morphologie du P.A. soit très variable, il est possible dans tous les cas de reconnaître la succession de deux phases:

- une première phase rapide de dépolarisation qui amène le potentiel membranaire de repos à la valeur zéro et qui se poursuit jusqu'à une valeur positive de + 20 ou + 40 mV (inversion du potentiel).

- une deuxième phase lente de repolarisation durant laquelle le potentiel membranaire est ramené à sa valeur de repos. C'est cette seconde phase qui donne ses caractéristiques propres à l'activité électrique d'un tissu cardiaque donné. La figure 9 donne des exemples de la variabilité de cette seconde phase. La vitesse de repolarisation détermine la durée du P.A.

Comme dans le cas des autres tissus excitables et notamment celui des fibres nerveuses (HODGKIN et HUXLEY, 1952 a, b, c et d) on peut penser que les changements du potentiel membranaire sont dus à des variations des perméabilités pour certains ions, entraînant, du fait de l'existence de gradients transmembranaires de concentration, des entrées ou des sorties d'ions et par conséquent le transfert de charges électriques à travers la membrane.

Si le potentiel de repos est dû à une perméabilité dominante pour les ions K^+ , la phase de dépolarisation résulte d'une augmentation rapide de perméabilité (ou de conductance) pour le sodium. Cette dépolarisation est contemporaine d'un courant entrant d'ions sodium créant un courant sortant d'ions potassium. Quant à la repolarisation, elle est due d'une part au fait que l'augmentation de conductance pour le sodium ne se maintient pas (inactivation sodique) et d'autre part à ce que la dépolarisation entraîne une augmentation retardée de la conductance potassique (rectification retardée ou normale). La figure 10 A extraite des travaux de HODGKIN et HUXLEY, rend compte de ces variations de perméabilités au cours du P.A. nerveux.

Ainsi les membranes excitables sont le siège de variations de conductances ioniques qui dépendent à la fois de la valeur du potentiel membranaire et du temps.

On admet (HODGKIN et HUXLEY, 1952 a et d; NOBLE, 1966) que l'aptitude des ions à traverser la membrane dépend de l'état "ouvert" (α) perméable ou "fermé" (β) imperméable, de "portes" membranaires spécifiques pour chacun des ions. La proportion des sites membranaires perméables au sodium est représentée par une variable d'activation m , n étant la proportion correspondante pour le potassium. Une dépolarisation brusque de la membrane entraîne une augmentation de la perméabilité au K^+ ; n augmente alors de façon exponentielle vers une nouvelle valeur stationnaire n_{∞} . En fait, l'expérience montre que l'augmentation de la conductance potassique en fonction du temps est une courbe sigmoïde. Ce résultat expérimental peut s'interpréter en admettant que la conductance ne dépend pas d'une seule porte, mais de plusieurs, indépendantes entre elles et qui se trouvent simultanément dans l'état α pour que le potassium puisse passer. Dans ces conditions, la conductance potassique g_{K^+} n'est pas proportionnelle à n , mais à une certaine puissance de n (n^4 dans le cas de l'axone géant de calmar) dépendant du nombre de portes qui contrôlent la perméabilité potassique. La représen-

tation des processus déterminant la conductance potassique est présentée sur la figure 11.

Au cours de la dépolarisation, la conductance sodique gNa^+ (donc m) augmente. Le fait que cette augmentation de gNa^+ ne se maintient pas lorsque la dépolarisation membranaire est maintenue constante (inactivation sodique) oblige à imaginer l'existence d'une porte supplémentaire contrôlant la perméabilité du "canal" sodique. Cette porte devra être ouverte au repos et se fermer avec une constante de temps assez grande, au cours des dépolarisations membranaires. Cette fraction de sites perméables est désignée par h . Dans ces conditions, la perméabilité sodique sera comme pour n proportionnelle à une certaine puissance de m (m^3 pour l'axone géant de calmar) et proportionnelle à h . Cet exposant 3 est proposé par NOBLE (1962) pour la conductance sodique rapide au niveau du myocarde. BESSEAU (1971), puis BESSEAU, GARGOUÏL et BERNARD (1972) justifient par une analyse en "curve fitting" la même valeur 3 de l'exposant pour la conductance lente calcique de la fibre cardiaque de grenouille.

Le schéma emprunté à NOBLE (1966) des processus déterminant la conductance sodique est présenté dans la figure 12. Les travaux de BERGMAN (1969) illustrent de façon claire l'évolution de ces divers paramètres dans le cas des fibres nerveuses myélinisées d'où est extraite la figure 13.

Récemment, les travaux de HAAS et KERN (1969) puis de HAAS, KERN, EINWÄCHTER et TARR (1971) mettent en cause la similitude entre la variable h déterminé par HODGKIN et HUXLEY dans le cas de l'axone géant de calmar et celle applicable au tissu cardiaque. En effet, le courant sodique rapide qui se développe lors d'une dépolarisation membranaire impose qu'au cours de la repolarisation du P.A. le système transporteur sodique soit progressivement réactivé. Alors que l'inactivation sodique présente une constante de temps de 1,5 à 8 ms, les processus de réactivation, très lents ont une constante de temps de 100 à 600 ms. Pour ces auteurs, la variable h doit être décomposée en ses deux paramètres (inactivation rapide et réactivation lente) dans le cas des tissus cardiaques (et notamment pour le myocarde auriculaire de grenouille), à l'exception semble-t-il du tissu de Purkinje.

2 - Propriétés électriques de la membrane cardiaque.

La théorie ionique a été étendue au tissu cardiaque, d'abord sur un plan spéculatif à partir des données indirectes obtenues par mesure des potentiels d'action intracellulaires ensuite de manière directe, par enregistrement à potentiel imposé ("voltage clamp") des courants ioniques transmembranaires. Il est maintenant bien admis que dans presque tous les tissus excitables, le potentiel d'action dépend initialement d'un courant entrant généralement sodique, suivi d'un courant sortant potassique. Ainsi dès 1951, DRAPER et WEIDMANN, puis

WEIDMANN (1951) considérant les résultats de l'enregistrement de la résistance membranaire sur du tissu conducteur de chèvre et par analogie avec les autres tissus excitables, suggèrent "que la phase ascendante dans le muscle cardiaque dépend d'une augmentation de la perméabilité sodique (...) et que la phase prolongée de dépolarisation peut être due soit à un délai très long dans l'apparition des processus d'inactivation de la perméabilité sodique soit au fait que l'augmentation de la perméabilité potassique est très tardive à se manifester" (in WEIDMANN, 1951). CORABOEUF, ZACOUTO, GARGOUIL et LAPLAUD (1958) par une technique de mesure de la résistance membranaire des cellules myocardiques ventriculaires, ont pu montrer que l'augmentation précoce de la résistance électrique membranaire au cours du P.A. était probablement liée au phénomène d'inactivation sodique selon la terminologie de HODGKIN, c'est-à-dire à la diminution de l'accroissement de la perméabilité sodique contemporaine de l'activité. La théorie ionique exige qu'au moment du plateau ventriculaire, la perméabilité au Na^+ reste grande par rapport à la perméabilité au K^+ , puisque le potentiel de la membrane demeure à ce moment fortement négatif par rapport à la valeur au repos. Ces remarques ont amené ces auteurs à penser que "la diminution de perméabilité totale ou partielle au sodium devrait donc, en principe, s'accompagner d'une diminution correspondante temporaire de la perméabilité pour les ions potassium, à l'inverse de ce qui se passe au niveau de la membrane des fibres nerveuses". La figure 10 B rend compte de ces modifications de perméabilité au Na^+ et au K^+ au cours du cycle cardiaque. La baisse de $g\text{K}^+$, hypothèse émise par CORABOEUF et coll. en 1958 puis confirmée par BRADY et WOODBURY en 1960, par HUTTER et NOBLE en 1960, par HALL et coll. en 1963, constitue un phénomène particulier nommé rectification anormale, observée antérieurement sur le muscle squelettique. Cette rectification anormale semble être une propriété générale des muscles striés (CORABOEUF, 1970). NOBLE (1960, 1962, 1966) en adaptant les équations de HODGKIN et HUXLEY au tissu de Purkinje admet l'existence d'une inactivation sodique incomplète et suggère l'existence de deux composantes dans la conductance potassique:

- une composante $g\text{K}^+_1$ indépendante du temps qui, lorsque le potentiel membranaire chute, diminue instantanément (rectification anormale).
- une composante $g\text{K}^+_2$ qui, au contraire de la précédente, augmente lentement à la suite de cette même dépolarisation (rectification retardée).

D'après la théorie ionique la dépolarisation rapide d'une membrane de cellule excitable est due à une entrée massive d'ions sodium. Dans ces conditions, la suppression du sodium extracellulaire doit aboutir rapidement à la suppression de la phase ascendante du P.A. Beaucoup de tissus excitables se comportent en effet de cette façon. Par contre, pour certains tissus cardiaques la privation sodique extracellulaire ne supprime pas pour autant la phase ascendante du P.A. Les tissus cardiaques de cobaye, de lapin, de tortue, d'axolotl

de grenouille entrent dans cette catégorie d'exception.

De très nombreux auteurs ont pu établir la participation des ions calcium aux courants transmembranaires responsables du développement du P.A. Citons par exemple REUTER (1965, 1966 et 1967), HAGIWARA et NAKA JIMA (1966), NIEDERGERKE et ORKAND (1966 a et b), CORABOEUF et VASSORT (1967 et 1968), ROUGIER, VASSORT, GARNIER, GARGOUIL et CORABOEUF (1968), LENFANT, MIRONNEAU, GARGOUIL et CORABOEUF (1968), BERNARD, GARGOUIL, ROUGIER, RAYMOND et GARNIER (1968 b), ROUGIER VASSORT, GARNIER, GARGOUIL et CORABOEUF (1969), VASSORT, ROUGIER, GARNIER, SAUVIAT, CORABOEUF et GARGOUIL (1969), GARGOUIL, LEOTY, POINDESSAULT et RAYMOND (1969), BERNARD et GARGOUIL (1970) BEELER et REUTER (1970 a et b), ROUGIER et VASSORT (1971), CHESNAIS, CORABOEUF, SAUVIAT et VASSAS (1971), LENFANT, MIRONNEAU et AKA (1972).

Ainsi, chez le cobaye (CORABOEUF et VASSORT, 1967 et 1968), seul le début de la phase ascendante est dû à une augmentation de gNa^+ , alors que la partie terminale de cette phase (et une partie du plateau) est due à une augmentation de la perméabilité calcique. Depuis les années 1965-1966, l'existence d'un courant dû à une entrée d'ions Ca^{2+} a pu être démontrée. Ce courant intervient au cours du plateau pour tous les tissus cardiaques et pour certains il apparaît au cours de la partie terminale de la phase ascendante du P.A. REUTER (1967) et REUTER et BEELER (1969 a et b) ont montré sur le ventricule de chien que l'intensité de ce courant variait proportionnellement à la concentration calcique extracellulaire et était augmenté sous l'action de l'adrénaline.

La participation d'un courant calcique au maintien du plateau présente le double avantage de permettre le développement de la contraction tout en imposant la dépolarisation membranaire durable, caractéristique des tissus cardiaques. GARNIER (1968), GARNIER et ROUGIER (1968) puis GARNIER, ROUGIER, GARGOUIL et CORABOEUF (1969) en augmentant considérablement la durée des P.A. du coeur de rat par suppression des ions bivalents du liquide de perfusion (clamp chimique) ont montré que le niveau du plateau dépendait de la concentration sodique extracellulaire. Ce plateau dû à l'existence d'un courant sodique n'est pas affecté par la tétródotoxine. Alors que dans les conditions normales le courant est calcico-sodique, en absence d'ions Ca^{2+} et Mg^{++} (+ EDTA), le plateau du P.A. peut être interprété, dans le cadre de la théorie ionique, en faisant intervenir une conductance sodique de cinétique lente et à inactivation lente. Tant que les courants transportant vers l'intérieur de la cellule des charges positives (Na^+ , Ca^{2+}) sont supérieurs aux courants transportant soit vers l'extérieur de la cellule d'autres charges positives (K^+ sortant), soit vers l'intérieur des charges négatives (Cl^- entrant), l'inversion de potentiel se maintient. Par l'application aux tissus car-

diaques des techniques de potentiel imposé (tissu conducteur de Mammifère par DECK et TRAUTWEIN, 1964; NOBLE et TSIEN, 1968 et 1969 a et b; ROUGIER et coll., 1968 a et b et 1969 sur les fibres atriales de grenouille), la mesure directe des courants ioniques transmembranaires a été rendue possible. Il a été montré, par cette technique (ROUGIER et coll., 1968) qu'au cours du P.A. cardiaque on pouvait reconnaître un courant sodique entrant initial, bloqué par la tétrodothine, et un courant entrant plus lent à la fois calcique et sodique bloqué par le manganèse (Mn^{2+} étant considéré comme un inhibiteur spécifique du courant lent calcique par HAGIWARA et NAKAJIMA, 1966). Ces observations ont conduit à imaginer l'existence de deux "canaux" (selon la terminologie de ROUGIER, VASSORT, GARNIER, GARGOUIL et CORABOEUF, 1968) permettant l'entrée d'ions dans la cellule au cours du P.A. Un canal rapide responsable de la phase ascendante et un canal lent responsable du plateau. La figure 14 (A et B) montre l'évolution des courants entrants et sortants au cours de l'activité des fibres atriales de grenouille.

Quant à la repolarisation membranaire ramenant la membrane d'un potentiel d'activité positif à un potentiel de repos négatif, DUDEL, PEPER, RÜDEL et TRAUTWEIN (1967) suggèrent que la partie initiale de la repolarisation pourrait être due à l'intervention d'une perméabilité pour les ions chlore (courant entrant de Cl^-).

La partie terminale de la repolarisation, d'après WEIDMANN (1956 b) est due à une sortie d'ions K^+ pendant le plateau. L'accumulation de cet ion dans les espaces extracellulaires entraîne une augmentation de gK^+ , le potassium en excès perméabilisant la membrane à lui-même selon CARMELIET (1961 a et b), HALL et coll. (1963). En fait, les travaux de NOBLE et TSIEN (1968 et 1969 a et b) et de BROWN et NOBLE (1969) sur le tissu de Purkinje montrent que les courants ioniques au cours de la repolarisation peuvent se subdiviser en plusieurs composantes. Trois composantes iK_2^+ , iX_1 et iX_2 sont dépendantes du temps. Elles se distinguent les unes des autres d'une part par les zones de potentiel dans lesquelles elles sont activées (de -100 à -60 mV pour iK_2^+ et de -50 à +20 mV pour iX_1 et iX_2) et d'autre part par les valeurs des constantes de temps avec lesquelles se développent les courants. Ces auteurs ont mis en évidence l'importance du courant sortant iK_2^+ dans la genèse de l'automatisme, mais aussi dans le déclenchement de la repolarisation des P.A. lorsque la membrane n'est pas soumise à un important courant entrant. Le courant iK_2 est rapidement activé au moment du plateau si ce courant sortant est peu intense et ne peut à lui seul assurer la repolarisation, le plateau du P.A. devrait se maintenir indéfiniment. NOBLE et TSIEN (1969 a et b) proposent alors deux composantes iX_1 et iX_2 correspondant à des courants sortants dont l'intensité augmente avec le temps et qui interviendraient au niveau du plateau. iX_1 et iX_2 diffèrent entre eux par leur constantes de temps (iX_2 activé beaucoup plus lentement et plus tardivement que iX_1) et par l'existence

d'une rectification instantanée vers l'intérieur (rectification anormale) de i_{X_1} que ne présente pas i_{X_2} .

Sur le tissu atrial de grenouille, ROUGIER et coll. (1969) ont montré que la repolarisation membranaire dépend de la suppression des courants entrants et de l'apparition d'une rectification retardée. BROWN et NOBLE (1969 a et b) sur ce même matériel ont décrit deux composantes semblables à i_{X_1} et i_{X_2} , mais n'ont pu mettre en évidence le courant i_{K^+2} . Récemment, LENFANT, MIRONNEAU et AKA (1972) dans une étude sur l'analyse des courants membranaires responsables de l'automatisme cardiaque dans la fibre sino-auriculaire de grenouille, concluent à une similitude avec les mécanismes induisant l'automatisme sinusal du coeur de Mammifère mis en évidence par LENFANT et coll. (1968 et 1970) et à l'absence de l'intervention de la deuxième composante du système retardé (i_{X_2}).

3 - Activité électrique des tissus cardiaques embryonnaires.

Les premiers enregistrements de l'activité électrique transmembranaire du coeur embryonnaire sont dus à FINGL, WOODBURY et HECHT (1952). Ces auteurs enregistrent l'activité électrique du myocarde ventriculaire de poulet à 3, 4, 6 et 7 jours d'incubation. Ils observent une augmentation du rythme cardiaque accompagnée d'une diminution de la durée du P.A. Ces changements intervenant avant l'établissement de l'innervation amènent les auteurs à penser à une maturation cellulaire au cours de l'ontogenèse plutôt qu'à une influence de l'innervation. En 1958, GARGOUÏL, CORABOEUF, DUBOIS et STRUDEL comparent les électrogrammes cellulaires cardiaques chez la lapine gravide et le fœtus entre 15 et 30 jours de gestation en conservant la circulation placentaire. Les P.A. maternels et embryonnaires sont nettement distincts tant dans leur décours que dans leur durée. GARGOUÏL, CORABOEUF, TRICOCHÉ et WALLON (1959) étudiant l'évolution des électrogrammes cardiaques du rat en hypothermie durant la croissance post-natale, constatent là aussi des modifications marquées portant sur le décours de la repolarisation au cours des différents âges (rats âgés de 48 heures, 8 jours, 3 semaines et 2 mois). Jusqu'en 1960, les études électrophysiologiques du coeur embryonnaire ne concernent que des stades déjà évolués de l'ontogenèse.

MEDA (1960), puis MEDA et FERRONI (1960) sur le coeur in situ abordent l'étude de l'automatisme cardiaque et montrent que si toutes les cellules myocardiques présentent initialement les signes de l'automatisme, après 37 heures d'incubation, seuls les P.A. de la région sino-atriale possèdent des prépotentiels.

En 1963, BERNARD et GARGOUÏL enregistrent l'activité électrique transmembranaire du ventricule de rat au cours de sa croissance fœtale, de 13 jours à 21 jours post-coïtum. Le décours des réponses évolue nettement et "pourrait refléter les modifications de la membrane "électrique" et de son environnement ionique".

A. - Coeur embryonnaire de poulet.

G. LE DOUARIN, OBRECHT et CORABOEUF (1964), OBRECHT, G. LE DOUARIN et CORABOEUF (1964), CORABOEUF, G. LE DOUARIN et OBRECHT (1965) ont pu montrer que le coeur entier d'embryon de poulet de 4 jours explanté en culture organotypique présentait une bonne stabilité des caractéristiques des P.A. des différentes régions anatomiques. Cette technique de survie durable avec maintien des caractéristiques électrophysiologiques allait permettre de nouvelles investigations difficilement réalisables sur le coeur in situ.

D'autre part, par fractionnement du ventricule isolé et par culture organotypique de ces fragments, ces auteurs confirment que l'automatisme ne résulte pas de l'activité physiologique de cellules particulières, mais est une propriété commune à tous les myoblastes cardiaques aux jeunes stades de développement (G. LE DOUARIN, OBRECHT et CORABOEUF, 1966). En 1966, KRESPI et SLEATOR, puis VAN MIEROP (1967) étudient l'initiation de l'automatisme cardiaque chez des embryons de 7 à 32 somites. Pour les premiers auteurs l'apparition de l'activité électrique est synchrone de l'apparition des contractions cardiaques et le décours des P.A. n'est stable et caractéristique qu'à partir du stade de développement de 20 somites. Par contre, VAN MIEROP enregistre dès le stade de 8 somites, donc avant l'apparition de l'activité contractile rythmique, une activité électrique présentant les caractéristiques de l'automatisme sinusal.

Ces résultats contradictoires ont amené OBRECHT-COUTRIS, G. LE DOUARIN et CORABOEUF (1968) et OBRECHT-COUTRIS (1970 et 1971) à reprendre ces travaux. Ces auteurs, dans une première série d'expériences, prélèvent l'ébauche cardiaque d'embryons de 9 somites. Le tube cardiaque est explanté en culture organotypique. Après quelques heures de culture l'ébauche cardiaque bat spontanément. Dans une deuxième série d'expériences, l'aire cardiaque présomptive d'embryons de 3 somites est prélevée et cultivée sur le milieu gélosé de WOLFF et HAFFEN: un tube cardiaque se différencie et au deuxième jour de culture l'activité électrique est enregistrée. Dans ces conditions, ils ont pu montrer qu'au cours de la phase initiale du fonctionnement du coeur, ce sont des cellules ventriculaires qui présentent les caractéristiques de l'automatisme (Fig. 15).

Les autres catégories cellulaires du myocarde se différencient ensuite et après quelques jours de culture de l'ébauche cardiaque, les potentiels de type sino-atrial sont les seuls à présenter une dépolarisation diastolique et un prépotentiel assurant la fonction de centre rythmeur du coeur.

D'ailleurs, cet automatisme à l'état latent qui existe dans toutes les catégories cellulaires du myocarde embryonnaire aux jeunes stades de l'ontogenèse se manifeste dans les cultures de cellules myocardiques dissociées préalablement par la trypsine (FÄNGE, PERSSON et

THESLEFF, 1957; CRILL, RUMERY et WOODBURY, 1959; LEHMKÜHL et SPERELAKIS, 1963, 1967; HARARY et FARLEY, 1960; KAUFMANN, TRITTHART, RODENROTH et ROST, 1969; DE HAAN et GOTTLIEB, 1968; etc...).

B. - Cœur embryonnaire de Mammifères.

Les études électrophysiologiques concernant le cœur embryonnaire de Mammifères sont beaucoup moins nombreuses.

Nous avons relaté précédemment les observations de GARGOUIL et coll. (1958, 1959) réalisées sur le fœtus de lapin et le rat nouveau-né. L'étude électrophysiologique du myocarde ventriculaire de l'embryon de rat a été réalisée par BERNARD et coll. (1963, 1967 a et b, 1968 a et c, 1969 et 1970 a et b).

En 1963, BERNARD et GARGOUIL ont montré qu'au cours de la croissance fœtale il apparaissait des modifications portant essentiellement sur les phases de repolarisation des P.A. ventriculaires. A 13 jours et demi post-coïtum le décours de la repolarisation confère au P.A. un aspect typiquement rectangulaire qui évolue par la suite vers un décours plus triangulaire, voisin de celui du rat nouveau-né. Ces importantes modifications du décours du P.A. ont été confirmées par TOTH (1965) sur ce même matériel en comparant les tracés obtenus à 10 jours post-coïtum, chez le nouveau-né et chez le rat adulte. On peut donc conclure à l'existence de modifications importantes des perméabilités membranaires au cours du développement. Ce changement dans le décours du P.A. entraîne une diminution de la durée; de 300 à 350 ms à 13 jours et demi, il atteint une valeur de 160 à 180 ms juste avant la naissance chez le rat.

Lors des premiers battements cardiaques la phase de dépolarisation du P.A. est très lente (5 à 8 V/s) et atteint à 13 jours et demi post-coïtum une vitesse de 35 à 45 V/s. Cette vitesse de phase ascendante reste stable jusqu'au 19ème jour et juste avant la naissance elle est de 45 à 55 V/s. Avant le 13ème jour, la partie ascendante du P.A. ne comporte qu'une phase, alors qu'après ce stade elle présente une rupture de pente (BERNARD, 1970). Tout ceci suggère donc que les mécanismes de l'électrogenèse cellulaire cardiaque évoluent au cours du développement embryonnaire.

De même, BERNARD et coll. (1963-1970) observent des variations importantes du potentiel membranaire de repos au cours du développement cardiaque chez le rat. A 10 jours post-coïtum, le potentiel membranaire de repos (P.M.R.) est de 40 à 55 mV et de 72 à 78 mV à 13 jours. Cette évolution est très progressive. Notons qu'à 10 jours la diastole n'est pas stable, contrairement au P.M.R. du ventricule de 13 jours. La valeur P.M.R. reste stable jusqu'au 19ème, 20ème jour où elle augmente notablement pour atteindre 80 à 85 mV. La figure 16 résume les modifications du P.M.R. de la vitesse de la phase ascendante du P.A. et

de la phase de repolarisation du myocarde ventriculaire de l'embryon de rat au cours du développement foetal (d'après BERNARD et coll., 1963, 1970).

La présence d'une pente de dépolarisation diastolique dans l'activité électrique ventriculaire du rat de 9 jours et demi post-coïtum qui régresse par la suite pour disparaître à 13 jours, rappelle tout-à-fait les observations de OBRECHT-COUTRIS, G. LE DOUARIN et CORABOEUF (1968) sur le coeur embryonnaire de poulet. Il semble donc que l'activité automatique initiale soit également dans le cas du rat, de nature ventriculaire.

C. - Coeurs embryonnaire et larvaire d'Amphibiens.

La culture organotypique des territoires présomptifs cardiaques d'Amphibiens anoures a été réalisée par BRIDE (1965, 1971) et par BRIDE et GOMOT (1967). Cette technique leur a permis d'obtenir la différenciation de tissu myocardique dans lequel ils distinguent deux types de P.A. : des P.A. sino-atriaux et des P.A. ventriculaires.

LAPLAUD, TRICOCHE et GARGOUÏL (1960), puis TRICOCHE, LAPLAUD, MONNEREAU et GARGOUÏL (1961) ont étudié chez la larve d'axolotl, les modifications apportées par la métamorphose à l'activité électrique cellulaire.

LAPLAUD et coll. (1960) ont montré que le plateau du P.A. ventriculaire est moins ample que celui de la grenouille et présente dans sa partie terminale une partie arrondie. Les pentes respectives du plateau des P.A. ventriculaires sont de 0,07 V/s chez la grenouille et de 0,15 V/s pour l'axolotl. D'autre part la durée du P.A. est de 500 ms, donc plus court que celui de la grenouille.

Pour ces auteurs, ces différences seraient d'ordre métabolique, en rapport avec la richesse du tissu myocardique en éléments contractiles.

TRICOCHE et coll. (1961) ont comparé les électrogrammes intracellulaires des myoblastes ventriculaires d'axolotl et d'amblystome. La métamorphose induite par injection de thyroxine provoque l'apparition de modifications importantes dans le décours des P.A.. Le P.A. de type rectangulaire chez la larve d'amblystome devient triangulaire, la repolarisation ne présentant plus deux phases nettement distinctes. La durée du P.A. est diminuée (290 ms) et le rythme spontané est augmenté (0,8 c/s chez l'axolotl; 1,3 c/s chez l'amblystome). La figure 17 rend compte des modifications de l'activité électrique cellulaire produites par la métamorphose. Le plateau étant "considéré comme la conséquence d'un passage à travers la membrane des ions K^+ vers l'intérieur de la cellule, ce transport actif dépendrait d'une "pompe" dont le fonctionnement est lié au métabolisme (CORABOEUF, 1960); il est possible de concevoir que des variations métaboliques accompagnant la métamorphose, influenceraient le fonctionnement de cette "pompe" entraînant ainsi des modifications de la repolarisation cardiaque".

Un travail récent de GROS et SCHREVEL (1970) cherche à établir une relation entre les modifications fonctionnelles du myocarde, induites par la métamorphose, et les changements ultrastructuraux (diminution du glycogène, redistribution des mitochondries, augmentation du nombre de myofibrilles et renforcement des contacts cellulaires).

De l'ensemble des résultats obtenus sur le coeur embryonnaire de diverses espèces de Vertébrés, il apparaît que l'activité électrique des cellules cardiaques évolue au cours de l'ontogenèse. Pour rendre compte de cette évolution, on peut invoquer des modifications des perméabilités membranaires initiales des cellules cardiaques et le développement progressif, à partir d'un certain stade de l'ontogenèse, de nouvelles perméabilités, l'ensemble de ces changements conduisant à l'état de différenciation achevée des cellules.

L'analyse de l'évolution de l'activité électrique cardiaque au cours du développement implique nécessairement l'étude du rôle des ions sur le potentiel membranaire à l'état de repos et lors de l'activité. Trois espèces ioniques occupent à cet égard une place privilégiée: le potassium, le sodium et le calcium. Il nous semble donc important d'indiquer dans une bibliographie, certes très incomplète, l'importance de chacun de ces ions dans le cycle cardiaque de façon à nous y référer lors de la discussion des résultats expérimentaux obtenus.

IV. - ACTION DE FACTEURS IONIQUES SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE CARDIAQUE.

=====

Les milieux intracellulaires et extracellulaires présentent des concentrations ioniques très inégales. D'une façon générale, les milieux intracellulaires sont hyperpotassiques, hyposodiques et hypocalciques par rapport au milieu extracellulaire. Dans le cas du coeur adulte de grenouille, LOWRY (1943), puis ROBERTSON et PEYSER (1951) trouvent des rapports de concentrations intracellulaire et extracellulaire pour le potassium et le sodium très voisins de ceux du nerf. Selon ces auteurs, le potassium serait 30 fois plus concentré dans le milieu intracellulaire que dans le plasma, tandis que le sodium ne serait que le dixième de la concentration plasmatique.

Selon HAJDU (1953), la concentration intracellulaire cardiaque mesurée globalement pour les ions K^+ et Na^+ chez la grenouille serait de 104 mEq/l environ. Dans le cas du coeur de rat, MONNEREAU-SOUSTRE (1970) obtient des concentrations ioniques qui diffèrent des résultats cités par HODGKIN (1951) et LOWRY (1943). Les valeurs indiquées par MONNEREAU-SOUSTRE sont les suivantes: K^+ externe, 4 mEq/l; K^+ interne, 148 mEq/l; Na^+ externe, 140 mEq/l; Na^+ interne, 31 mEq/l; Cl^- externe, 120 mEq/l et Cl^- interne, 19 mEq/l. Les données actuelles concernant le Ca^{2+} ne portent que sur la valeur totale (Ca^{2+} externe + Ca^{2+} interne), mais il apparaît certain que les milieux intracellulaires sont très nettement hypocalciques par rapport au plasma. KLEIN (1960, 1963) a pu déterminer par la technique de spectrophotomé-

trie de flamme la teneur en sodium et potassium du coeur embryonnaire de poulet et suivre l'évolution de ces concentrations ioniques au cours du développement.

Alors que les concentrations extracellulaires en sodium et potassium varient peu au cours de l'ontogenèse et sont respectivement de 100 à 130 mM pour le Na^+ et de 5 à 10 mM pour le K^+ , les concentrations intracellulaires pour ces ions subissent, surtout dans le cas du sodium, d'importantes modifications.

A 2 jours d'incubation, la concentration interne en Na^+ des cellules ventriculaires est de 600 mM en moyenne, à 3 jours de 400 mM, à 4 jours de 200 mM, à 7 jours de 81 mM. Trois jours après l'éclosion la concentration en Na^+ interne est de 31 mM. Alors que la teneur en Na^+ interne décroît, la concentration potassique interne augmente et de 67 mM à 2 jours, atteint 86 mM à 13 jours. A l'éclosion la concentration potassique interne est de 75 mM environ.

Récemment, THURESON-KLEIN et KLEIN (1971) ont pu montrer histochimiquement au microscope électronique qu'aux jeunes stades du développement la forte teneur en Na^+ interne était due à l'extrême richesse de la gelée cardiaque en cet ion. Ces mêmes auteurs ont indiqué également qu'au cours des deux premiers jours d'incubation le Ca^{2+} et peut-être le Mg^{2+} sont localisés entre les membranes externe et interne des mitochondries. A 3 jours et demi, le taux de ces cations bivalents est très faible à ce niveau, ce sont alors les myofibrilles qui en sont richement pourvues.

Ces différences de concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane cellulaire cardiaque au cours du développement embryonnaire doivent être responsables, au moins partiellement, des différences observées entre l'activité électrique du myocarde embryonnaire et celle du myocarde adulte.

1 - Rôle des ions sodium.

De nombreux auteurs ont montré qu'il existe une relation entre la concentration extracellulaire en sodium et l'amplitude de la pointe du P.A. DRAPER et WEIDMANN (1951), puis WEIDMANN (1957) constatent sur le tissu conducteur, que les milieux hyposodiques diminuent l'amplitude du P.A., ralentissent la pente de dépolarisation et augmentent légèrement la valeur de la polarisation diastolique. CRANFIELD et coll. (1951) confirment ces observations sur le ventricule de tortue.

Mais les milieux hyposodiques ne produisent pas toujours cette diminution de l'amplitude du P.A. En 1956, CORABOEUF et OTSUKA observent que le ventricule de cobaye ne répond pas aux milieux hyposodiques comme le prévoit la théorie ionique. En effet, un milieu externe appauvri de 75 % de sa teneur en sodium ne produit pas de diminution de la pointe du P.A. Par contre, chez le rat adulte, CORABOEUF et coll., 1959 et WALLON et coll., 1959, mon-

trent qu'un milieu de perfusion, ne contenant que 10 % de sodium par rapport au liquide de perfusion normal, entraîne une baisse de l'amplitude du P.A. et conduit en quelques minutes à la disparition des activités mécaniques et électriques. BERNARD (1970) montre que le coeur embryonnaire de rat de 10 jours post-coïtum perfusé par un liquide ne contenant que 10 % du sodium "normal" ne manifeste qu'une très légère diminution de la pointe du P.A. (de 8 à 10 mV). L'activité électrique est maintenue très longtemps. A ce stade, la phase ascendante du P.A. est lente. A 13 jours post-coïtum, une telle réduction du Na^+ externe produit une diminution de l'overshoot de 15 à 20 mV et à 21 jours, une baisse un peu plus importante, de 20 à 30 mV.

Chez la grenouille, NIEDERGERKE et ORKAND (1966 b), puis ROUGIER (1968 et 1968a) observent que l'overshoot est très réduit quand le sodium est remplacé par du saccharose. Cependant, dans le cas où seulement 10 % du Na^+ externe est conservé, la théorie ionique prévoit une diminution de 58 mV de l'amplitude du P.A., alors que la diminution effectivement obtenue n'est que de 17,3 mV. Devant de tels résultats, il faut admettre que l'ion sodium n'est pas le seul à intervenir dans la phase ascendante des P.A. de cobaye (CORABOEUF et VASSORT, 1967, 1968), de grenouille (ROUGIER, 1968; ROUGIER et coll., 1968a, 1969 et 1971), de lapin (LENFANT et coll., 1968 et 1970). Dans de telles préparations, comme l'ont signalé REUTER (1967), puis REUTER et BEELER (1969) le calcium pourrait intervenir dans la phase de dépolarisation du P.A., cet ion constituant en effet une pile de concentration d'environ + 150 mV. En milieu hyposodique LUTTGAU et NIEDERGERKE (1958), puis LANGER (1964) et GUILBAULT (1966) sur des préparations différentes qui sont respectivement le ventricule de grenouille, le ventricule de chien et le ventricule de rat et de cobaye, ont montré que la privation partielle sodique avait un effet inotrope positif dû à des entrées d'ions Ca^{2+} dans les cellules. Récemment, BAKER et coll. (1969) ont montré que le flux entrant calcique était nettement accru par la réduction de la concentration sodique externe dans le cas de l'axone de calmar.

De ces résultats, on peut conclure avec LANGER (1970) qu'une "diminution de la concentration sodique externe ou une augmentation de la concentration interne de cet ion sont associées à un mouvement d'ions Ca^{2+} vers le compartiment intracellulaire".

Les milieux hyposodiques produisant des effets inotropes positifs, il faut admettre avec NIEDERGERKE et LUTTGAU (1957) et LUTTGAU et NIEDERGERKE (1958) que les ions sodium et calcium sont compétitifs pour un transporteur commun; en milieu hyposodique le Ca^{2+} entrerait donc plus aisément. Cette compétition entre les ions Na^+ et Ca^{2+} nous conduit à analyser les effets des variations de la concentration externe en ions calcium sur l'activité électrique cardiaque.

2 - Rôle des ions calcium.

En ce qui concerne cet ion, les données bibliographiques sont multiples et très diversifiées quant à son mode d'intervention dans la genèse de l'activité électrique et à son rôle dans la contraction cardiaque. Les premières expériences concernant ce problème sont dues à TRAUTWEIN et WITT (1952) sur le coeur de grenouille. Les milieux hypocalciques ont un effet chronotrope positif sur ce matériel; le potentiel de repos passe de -55 à -62 mV et le plateau du P.A. se raccourcit.

Selon WARE, BENNETT et MAC INTYRE (1955) le calcium est sans effet tant sur le P.A. que sur le P.M.R., alors que d'autres auteurs (BROOKS et coll., 1955; HOFFMAN et coll., 1956; WALLON, 1960) mettent en évidence une accélération de la repolarisation en milieu hypercalcique. Les milieux hypocalciques diminuent l'amplitude du P.A. et augmentent la durée sur le coeur de chien (HOFFMAN et SUCKLING, 1956) et sur celui de cobaye (CORABOEUF et GARNIER, 1960). Chez le rat, CORABOEUF et GARNIER (1961), puis GUILBAULT, CORABOEUF, GARNIER et PADEL (1962) mettent en évidence une faible diminution de l'amplitude du P.A., l'effet principal des milieux hypocalciques se traduisant par une augmentation importante de l'amplitude du plateau.

Sur les fibres de Purkinje, une réduction de la concentration calcique entraîne un accroissement de la fréquence de l'activité électrique (WIEDMANN 1955a) et dans le cas des fibres initialement quiescentes une telle réduction peut induire un automatisme (MAC BROOKS et coll., 1955).

Cette action des milieux hypocalciques dans le cas du tissu de Purkinje s'interprète en général en admettant que la diminution du calcium externe diminue le seuil de dépolarisation membranaire sans affecter notablement la dépolarisation diastolique. De la même manière, les milieux externes hypercalciques augmentent le seuil de la dépolarisation, ce qui a pour effet de ralentir le rythme des battements. WEIDMANN a montré en 1955 que le calcium diminuait la conductance sodique, ce qui va dans le même sens qu'une élévation du seuil de dépolarisation. Il est à présent bien établi que le calcium extracellulaire est capable de pénétrer à l'intérieur des cellules cardiaques. Cet influx calcique est d'autant plus facile que les membranes sont en activité. NIEDERGERKE (1963) a pu montrer sur l'oreillette de cobaye que la quantité de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ absorbée à chaque battement est 15 fois plus grande que celle qui est absorbée par seconde au repos. Le Ca^{2+} qui pénètre ainsi dans la cellule à travers la membrane au cours de la dépolarisation participe au développement du courant d'ions entrant par le canal lent calcico-sodique dont nous avons souligné l'existence précédemment (GARGOUIL et coll., 1969; BEELER et coll., 1970 b; VASSORT et coll., 1971).

Chez l'embryon de rat, une perfusion par un milieu ne contenant que 10 % du Ca^{2+} externe de la solution physiologique "normale" produit à 10 jours post-coïtum une réduction importante (de l'ordre de 25 mV.) de la pointe du P.A. La pente de dépolarisation diastolique est diminuée et le rythme spontané est ralenti (BERNARD, 1970). A 13 jours et 21 jours post-coïtum, cette même solution hypocalcique entraîne une diminution de 10 à 18 mV de l'inversion de potentiel. La valeur du P.M.R. n'est pas modifiée; la durée du P.A. est légèrement augmentée. Il est intéressant de remarquer qu'à 10 jours post-coïtum, la membrane se comporte comme une électrode au calcium lors de la dépolarisation et la part qui revient au sodium est très faible. A ce stade du développement, la conductance calcique du type canal lent (selon la terminologie de ROUGIER, VASSORT, GARNIER, GARGOUIL et CORABOEUF, 1968) doit être la seule qui intervient dans l'activité régénératrice puisque, selon BERNARD (1970), même après l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire, la conductance sodique rapide ne peut être activée.

Récemment, CORABOEUF, G. LE DOUARIN et OBRECHT-COUTRIS (1970) ont montré que le coeur du jeune embryon de poulet de 3 jours d'incubation semblait insensible à des variations de la concentration calcique s'échelonnant de 1,3 à 5,4 mM/l. Certains auteurs (GOSSWEILLER et coll., 1954; MAC BROOKS et coll., 1955) admettent un couplage entre l'entrée calcique et la sortie potassique, l'entrée de calcium perméabilisant la membrane au potassium. Cette théorie à laquelle se rallie GUILBAULT (1966), permet d'expliquer l'effet inotrope positif initial des milieux hyposodiques tant sur le coeur de rat que sur le coeur de cobaye.

3 - Rôle des ions potassium.

Les effets inotropes négatifs d'un excès d'ions K^{+} sur le coeur sont connus depuis longtemps (RINGER, 1883; HERMANN, 1932). Les milieux hypopotassiques produisent les effets inverses. Dans le cas de milieux très fortement hypopotassiques, le P.M.R. est très diminué, n'étant plus que de 50 mV environ dans un milieu dépourvu de cet ion (WEIDMANN, 1956a). En ce qui concerne les modifications de la durée du P.A., les résultats obtenus sont très diversifiés selon les préparations cardiaques utilisées. Ainsi, LEPESCHKIN et coll. (1957) indiquent que la diminution de la concentration en K^{+} externe des milieux de perfusion produit une augmentation de la durée du P.A. du coeur de Mammifère et un ralentissement de la phase de repolarisation.

CORABOEUF et coll. (1961) ont montré que les milieux hypopotassiques produisent une augmentation de la durée du P.A. (plus importante chez le rat que chez le cobaye) due à un maintien prolongé du plateau. Sur le noeud sino-auriculaire de lapin, SUEKANE et CORABOEUF (1964) montrent qu'une concentration potassique externe réduite augmente la pente de la dépolarisation diastolique. On peut admettre avec WEIDMANN (1957) que cette phase ré-

sulte d'une augmentation de la perméabilité au sodium et d'une diminution de la perméabilité potassique.

Les expériences d'injections brèves de potassium pendant le P.A. sur le coeur de tortue à basse température ont permis à WEIDMANN (1956 b) de montrer que l'ion K^+ dépolarise la fibre quiescente, mais accélère la repolarisation de la fibre en activité. Dans le cas de cette dernière préparation, la théorie ionique ne peut rendre compte de cette accélération. WEIDMANN émet l'hypothèse que les ions K^+ perméabilisent la membrane à eux-mêmes et les expériences de CARMELIET (1960) à l'aide du $^{42}K^+$ ou l'étude de l'action de l'adrénaline dans des milieux ioniques déséquilibrés sur des fibres de Purkinje (CARMELIET et coll., 1969) en apportent la preuve. Mais on peut penser également que les ions K^+ diminuent g_{Na^+} ou stimulent le fonctionnement de la pompe à sodium permettant ainsi la sortie de cations. Ce dernier point a pu être mis en évidence sur le muscle couturier de grenouille par KEYNES (1954) à l'aide d'éléments marqués: l'accroissement de la concentration en K^+ externe accélère la sortie d'ions Na^+ .

Sur le coeur embryonnaire de rat, BERNARD (1970) montre qu'une réduction de 50% de la concentration potassique externe produit des modifications variables de l'activité électrique selon l'âge de l'embryon. Ainsi, à 13 jours post-coïtum, la durée du P.A. augmente de 15 % et le P.M.R. diminue de 5 à 10 mV. Cette baisse du P.M.R. entraîne une diminution de l'amplitude de l'overshoot et de la vitesse de la phase ascendante du P.A. Toutes les solutions hypopotassiques produisent, à ce stade du développement, l'apparition d'une pente de dépolarisation diastolique. A 16 jours et 21 jours post-coïtum, la sensibilité aux milieux hypopotassiques diminue. Tant à 16 jours qu'à 21 jours, des milieux externes réduits de 50 % et de 90 % en potassium produisent une hyperpolarisation membranaire au repos (10 à 15 mV); par contre, la durée du P.A. n'est pas modifiée. Cependant une perfusion du coeur de 16 et 21 jours post-coïtum par des milieux dépourvus totalement de K^+ ne produit pas les mêmes effets à ces deux stades. A 16 jours, l'absence complète de K^+ externe exerce une action comparable à celle qui est obtenue sur le coeur d'un embryon de 13 jours, avec l'apparition d'une pente de dépolarisation, alors qu'à 21 jours post-coïtum la seule modification notable est l'hyperpolarisation au repos, la diastole restant isopotentielle.

Au niveau de la fibre ventriculaire de rat adulte, il existe une relation linéaire entre le logarithme de la concentration externe en K^+ et le potentiel de repos (MONNEREAU-SOUSTRE, 1970). Cette droite s'infléchit pour les valeurs très faibles en K^+ externe. Les relations trouvées par BERNARD (1970) montrent une pente inférieure à la valeur théorique (58 mV) donnée par l'équation de NERNST. Cet auteur conclut que le P.M.R. embryonnaire n'est pas un simple potentiel de pile de concentration au K^+ , mais un potentiel de diffusion à plusieurs ions.

Cette différence de sensibilité pour les milieux hypopotassiques entre le myocarde embryonnaire jeune et le myocarde embryonnaire plus âgé sera discutée au cours de l'exposé de nos résultats. Dès à présent, il est intéressant de noter que des perturbations même faibles dans les concentrations ioniques des milieux externes peuvent modifier considérablement l'activité électrique. La théorie ionique du potentiel de repos prévoyant une hyperpolarisation membranaire lorsque le K^+ externe est réduit, l'apparition d'une dépolarisation diastolique dans l'activité électrique cellulaire des premiers stades de l'ontogenèse ne peut s'expliquer par une perméabilité exclusive aux ions K^+ . La figure 18 illustre les effets des privations ioniques sur le coeur embryonnaire de rat (BERNARD, 1970).

Compte tenu des différences de comportement existant entre les divers tissus cardiaques chez l'adulte, on peut se demander si cette observation faite sur le rat a une valeur générale pour tous les tissus cardiaques embryonnaires ou si, au contraire, elle n'a qu'un caractère limité à cette espèce.

MATERIEL ET METHODES

I. - TECHNIQUES DE PREPARATION DU MATERIEL EXPERIMENTAL.

- 1 - Technique de prélèvement du blastoderme.
- 2 - Réalisation de préparations cardiaques à partir de jeunes embryons.
- 3 - Prélèvement de préparations cardiaques à partir d'embryons âgés.
- 4 - Obtention de préparations ventriculaires automatiques.
- 5 - Méthode d'isolement du mésoderme précardiaque.

II. - TECHNIQUES DE CULTURE IN VITRO.

III. - LIQUIDES DE PERFUSION.

- 1 - Milieu de perfusion "normal".
- 2 - Milieux de perfusion déséquilibrés ioniquement.
- 3 - Addition d'inhibiteurs de perméabilité.
- 4 - Administration de substances pharmacologiques.

IV. - ENREGISTREMENT DES PHENOMENES ELECTRIQUES.

- 1 - Cuve à perfusion.
- 2 - Méthode d'enregistrement de l'activité électrique.
- 3 - Entraînement électrique.
- 4 - Application de courants transmembranaires imposés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expériences ont été réalisées chez l'embryon de poulet. Les oeufs proviennent d'un même élevage de poules de race Arbor Acres. Les oeufs sont incubés artificiellement à la température de 38°C, en atmosphère humide.

Parmi les ouvrages consacrés à l'embryologie descriptive des Oiseaux et particulièrement à l'organogenèse cardiaque du poulet nous nous sommes adressés à deux traités classiques: Lillie's Development of the chick (1952) et The Avian Embryo (ROMANOFF, 1960).

I. - TECHNIQUES DE PRÉPARATION DU MATÉRIEL EXPERIMENTAL.

=====

1 - Technique de prélèvement du blastoderme.

On découpe dans la coquille de l'oeuf incubé une petite fenêtre qui permet d'atteindre le blastoderme recouvert par la membrane vitelline. A l'aide de ciseaux à extrémités courbes, on pratique une incision circulaire dans la membrane vitelline et le jaune de l'oeuf, autour du blastoderme. La région découpée est prélevée à l'aide d'une spatule perforée et amenée dans une coupelle contenant du liquide de Tyrode. L'embryon est soigneusement lavé et débarrassé des granules vitellins entraînés lors du prélèvement. La membrane vitelline est éliminée et le blastoderme est placé dans un petit cristalliseur dont le fond est recouvert par un mélange de paraffine et de noir animal. L'aire extraembryonnaire est épinglée sur le fond de paraffine et recouverte de liquide de Tyrode à la température ambiante. L'embryon est observé par sa face ventrale.

2 - Réalisation de préparations cardiaques à partir de jeunes embryons.

Les coeurs des embryons de 24 heures d'incubation à 6 jours sont laissés in situ et l'embryon est placé en totalité dans la cuve de perfusion. Il est en effet impossible de fixer dans la cuve de perfusion un tube cardiaque provenant d'un embryon de 20 ou 30 somites sans causer des dommages importants à la préparation. L'embryon, débarrassé de ses membranes, est donc épinglé sur sa face dorsale en légère extension dans le fond de la cuve de perfusion thermostatée à 38°C. Le maintien en survie du coeur est assuré par une circulation de liquide de perfusion oxygéné. Dans ces conditions la survie est durable (12 à 24 heures).

3 - Prélèvement de préparations cardiaques à partir d'embryons âgés.

La survie du coeur étant grandement conditionnée par l'irrigation du tissu myocardique, dès 6 jours d'incubation, le myocarde est trop épais pour qu'une simple imbibition suffise à le maintenir en survie prolongée.

A partir de ces stades de développement et jusqu'à l'éclosion, nous prélevons, dans le ventricule droit, parallèlement à la cloison interventriculaire des lambeaux myocardiques minces. Ces lambeaux sont portés dans la cuve de perfusion et fixés à chacune de leurs extrémités sous une légère tension. L'entraînement électrique de la préparation est assuré par un neuroexcitateur. Les chocs électriques délivrés sont envoyés à la préparation par l'intermédiaire d'une unité d'isolement. La survie des lambeaux ventriculaires ainsi obtenus est de plusieurs heures (4 à 6 heures environ).

4 - Obtention de préparations ventriculaires automatiques.

Au cours de nos expériences, il nous a paru intéressant de comparer l'action de milieux déséquilibrés en ions ou celle de divers inhibiteurs de perméabilité d'une part sur le ventricule entraîné (coeur in situ ou lambeau ventriculaire), d'autre part sur des fragments ventriculaires placés en culture in vitro et battant spontanément. En effet, G. LE DOUARIN, OBRECHT et CORABOEUF (1964), CORABOEUF, G. LE DOUARIN et OBRECHT (1965) et OBRECHT (1970) ont montré que des fragments ventriculaires provenant du coeur d'embryons de poulet de 3 ou 4 jours d'incubation battent spontanément. Les différentes caractéristiques des P.A. ventriculaires sont conservées, mais il apparaît dans une région limitée du fragment explanté un centre d'automatisme se traduisant par l'apparition d'une dépolarisation diastolique (Fig. 19).

Nous prélevons la région ventriculaire chez des embryons de 3 et 4 jours d'incubation. Le ventricule est fragmenté en quatre ou cinq parties. Les fragments sont explantés dans une boîte de pétri stérile de 4 cm de diamètre et de 2 cm de hauteur. Sur le fond de cette boîte de pétri est déposée une lamelle de verre (lamelle couvre-objet) recouverte par 2,5 ml de milieu liquide. Les explants, après 24 à 48 heures de culture en milieu liquide, adhèrent à la lamelle de verre. Pour l'expérimentation celle-ci est extraite de la boîte de pétri et placée dans la cuve à perfusion. Dans les conditions de culture réalisées par le milieu liquide, les fragments ventriculaires conservent une activité spontanée pendant plusieurs semaines. Cet aspect et la taille de l'explant (de 0,25 à 0,5 mm environ de diamètre) persistent tout le temps de la culture.

5 - Méthode d'isolement du mésoderme précardiaque.

Il nous a paru intéressant de comparer les perméabilités ioniques membranaires du tissu myocardique différencié in vivo à celles du tissu myocardique différencié in vitro. Pour cela, nous avons prélevé le mésoderme précardiaque d'embryons aux stades du prolongement céphalique à celui de 5 somites.

Les aires cardiaques prélevées sont amenées dans une solution de trypsine à 1 % (Difco) dans du liquide de Tyrode sans calcium ni magnésium, selon la méthode de MOSCONA et MOSCONA (1952) adaptée par N. LE DOUARIN (1964) aux feuillets embryonnaires des jeunes blastoderms. Après un séjour de 10 minutes environ des aires cardiaques dans cette solution maintenue à 4°C par un bain de glace fondante, elles sont placées dans une solution de sérum de poulain dans du liquide de Tyrode de façon à épuiser l'excès de trypsine et à arrêter la dissociation enzymatique ébauchée.

Les trois feuillets, endoderme, mésoderme et ectoderme, qui sous l'action de la solution de trypsine ont commencé à se séparer, sont isolés mécaniquement à l'aide de deux microscalpels (fig. 20). Cette technique utilisée par G. LE DOUARIN (1965), par G. LE DOUARIN et coll. (1965, 1966, 1967 a et b, 1969), par N. LE DOUARIN et coll. (1967), par NANOT (1970, 1971 a et b), par RENAUD (1969) et RENAUD et coll. (1968 a et b, 1969, 1970), a permis d'obtenir à l'état isolé le mésoderme de l'aire cardiaque chez l'embryon de poulet ou chez l'embryon de souris.

Le mésoderme de l'aire cardiaque présomptive ainsi isolé est placé en culture in vitro dans des conditions identiques à celles des fragments ventriculaires. Après 24 à 48 heures de culture, le tissu myocardique différencié, comme en témoigne l'activité spontanée, est adhérent à la lamelle de verre. Les explants sont alors transférés dans la cuve de perfusion en vue de l'étude électrophysiologique.

II. - TECHNIQUES DE CULTURE IN VITRO.

=====

Le matériel utilisé est rigoureusement stérile et les prélèvements sont effectués en complète asepsie obtenue par irradiation des cabines de culture aux rayons ultra-violets.

Les travaux de G. LE DOUARIN et coll. (1965, 1966) mettant en évidence la capacité d'autodifférenciation du mésenchyme de l'aire cardiaque étaient réalisés sur un milieu gélosé selon la méthode de WOLFF et HAFFEN (1952). Cette méthode consiste à fournir à l'explant un milieu nutritif incorporé à un substratum gélosé. La composition du milieu "standard" de ces auteurs est la suivante:

- 7 volumes de gélose à 1 % dans du liquide de Gey
- 3 volumes de liquide de Tyrode
- 3 volumes d'extrait embryonnaire
- 150 U.I. de pénicilline (Spécilline G.)

Nous avons utilisé également un milieu "enrichi" qui dérive du milieu standard de WOLFF et HAFFEN par substitution du sérum de poulain (3 volumes) au liquide de Tyrode, ce qui réalise un enrichissement en substances organiques par rapport au milieu standard.

Dans ces conditions, la survie du tissu myocardique différencié (coeurs entiers, fragments de coeur) ou qui se différencie in vitro à partir du mésoderme n'excède pas 4 jours. C'est pourquoi, dans un premier temps de notre travail (G. LE DOUARIN et RENAUD, 1967) nous avons cherché à préciser des conditions de culture permettant une longue survie de l'explant avec persistance de l'activité physiologique spontanée. Pour cela, nous avons utilisé le milieu liquide de croissance de RINALDINI (1959) préconisé par cet auteur pour la culture des myoblastes cardiaques, dont la composition est la suivante:

- 7 volumes de liquide de Tyrode
 - 20 % de sérum de poulain filtré
 - 10 % d'extrait embryonnaire
 - 3 000 U.I. de pénicilline (Spécilline G.), par ml de milieu
- Le pH du milieu de culture est de 7,4 - 7,8.

L'extrait embryonnaire est préparé au laboratoire à partir d'embryons de poulet de 8 à 9 jours d'incubation. Les cultures sont incubées dans l'air dans des enceintes thermostatées à 38°C et le milieu liquide est renouvelé quotidiennement. Dans ces conditions, l'activité spontanée est maintenue pendant 3 à 4 semaines.

III. - Liquides de perfusion.

1 - Milieu de perfusion "normal".

Le maintien en survie des différents tissus myocardiques dans la cuve de perfusion est réalisé par une perfusion continue à débit constant d'un liquide dérivant du milieu de croissance de RINALDINI. Il est constitué par une solution de liquide de Tyrode tamponnée au pH 7,4 à 7,6 par du bicarbonate de sodium. A cette solution on incorpore 2 % de sérum de poulain filtré et 0,8 % d'extrait embryonnaire. L'activité électrique témoin du tissu myocardique est prise dans ce milieu de perfusion que nous qualifierons de "normal". Le principal apport d'ions est réalisé par le liquide de Tyrode dont la composition en sels est la suivante (par litre):

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
CaCl ₂	1,4 mM
MgCl ₂	0,5 mM
NaH ₂ PO ₄	0,37 mM
NaHCO ₃	4 mM
glucose	1 g.

2 - Milieux de perfusion déséquilibrés ioniquement.

A. - Milieux hyposodiques

Pour maintenir l'osmolarité de la solution de perfusion, on substitue mole à mole du chlorure de choline au chlorure de sodium. Nous avons utilisé couramment des solutions contenant 50 %, 10 % et 0 % de sodium par rapport à la solution "normale".

B. - Milieux hypopotassiques

Nous avons expérimenté des solutions de perfusion contenant 10 % et 0 % de la concentration potassique "normale". Dans ce cas, l'osmolarité n'est pas rétablie, le chlorure de potassium n'intervenant à cet égard que d'une façon négligeable par rapport au chlorure de sodium.

C. - Milieux hypocalciques

Pour la même raison, la diminution des ions Ca^{2+} de la solution de perfusion normale n'est pas compensée. Nous avons utilisé des milieux ne contenant que le dixième de la concentration calcique normale, ainsi que des milieux totalement dépourvus de calcium.

3 - Addition d'inhibiteurs de perméabilités.

A. - Tétradotoxine: (TTX)

La TTX (Sigma) est directement injectée dans la cuve de perfusion. Le volume de TTX administré est calculé de façon à obtenir une concentration finale dans le liquide de la cuve variant selon les expériences de 10^{-4} g/ml à 10^{-8} g/ml, la concentration la plus fréquemment utilisée ayant été de 10^{-6} g/ml. Au moment de l'injection de TTX, la perfusion est arrêtée. Nous nous sommes assurés au préalable que l'absence de perfusion ne provoquait pas de modifications de la persistance de l'activité spontanée d'une part et des caractéristiques de l'activité électrique d'autre part. Ces dernières restent stables pendant une heure et demie

à deux heures en absence de perfusion, donc pendant un laps de temps largement suffisant pour la réalisation de nos expériences.

B. - Tétraéthylammonium (TEA)

De la même façon, lors de l'administration de cette substance, la perfusion est arrêtée. La concentration la plus fréquemment utilisée a été de 5 mM/l. Le TEA (Fluka) est mis en solution dans du liquide de Tyrode "normal" tamponné au bicarbonate de sodium.

C. - Manganèse (Mn^{2+}) et Lanthane (La^{3+}).

Nous avons utilisé respectivement les concentrations de 5 mM/l et de 2 mM/l. Ces deux ions sont administrés sous forme de chlorures. Ils sont mis en solution dans le liquide de Tyrode "normal" utilisé pour la perfusion, tamponné au tris-HCl au pH 7,4.

4 - Action de substances pharmacologiques.

Notre travail s'est limité à l'étude des effets de catécholamines exogènes: adrénaline et noradrénaline.

L'étude des effets de ces substances a été réalisée selon deux protocoles expérimentaux. Nous avons étudié soit les modifications de l'activité électrique dues à l'administration de drogues, soit les effets chronotropes de ces drogues sur l'activité spontanée du tissu myocardique.

A. - Dans l'étude des modifications de l'activité électrique dues aux substances pharmacologiques, celles-ci sont additionnées au liquide de perfusion de la cuve après suppression de l'écoulement.

B. - Pour l'étude des effets chronotropes des catécholamines, nous nous sommes attachés à réduire les causes d'erreurs inhérentes aux variations de température. Les solutions d'adrénaline et de noradrénaline utilisées ainsi que les pipettes servant à la manipulation sont placées 30 minutes avant l'expérimentation dans la même enceinte thermostatée à 38°C que les préparations cardiaques. Pour éviter l'oxydation des catécholamines, les solutions sont placées dans des récipients hermétiquement bouchés et à l'abri de la lumière.

Les coeurs prélevés sont placés dans une boîte de pétri contenant 2,5 ml de milieu liquide RINALDINI et placés dans l'enceinte thermostatée. Avant d'administrer les drogues, nous évaluons les rythmes spontanés des coeurs embryonnaires 3 fois à des intervalles de 5 minutes entre chaque comptage. Les préparations présentant des fluctuations du rythme ne sont pas utilisées pour l'étude de l'action des catécholamines.

Les cultures et les solutions pharmacologiques utilisées et la loupe binoculaire d'observation étant placées à la même température constante, les erreurs dues à d'éventuelles variations de température nous paraissent être minimisées.

IV. - ENREGISTREMENT DES PHENOMENES ELECTRIQUES.

=====

1 - Cuve de perfusion.

Le matériel expérimental est placé dans une cuve à perfusion en plexiglass. La quantité de liquide de perfusion est maintenue constante (10 ml) par un dispositif assurant une aspiration du trop plein ne créant pas de turbulence dans la cuve. Les liquides de perfusion sont amenés à la cuve par un tube de verre de petit diamètre situé à l'une des extrémités de la cuve. De façon à éviter les turbulences créées par l'écoulement des liquides, les extrémités des tubulures d'arrivée et d'aspiration du liquide de perfusion dans la cuve sont protégées par des cloisons finement percées jouant le rôle de brise-bulles.

La température à l'intérieur de la cuve est maintenue à 38°C par un bain-marie à circulation d'eau dans lequel elle est partiellement immergée. Les liquides de perfusion s'écoulent par des serpentins de verre placés dans le bain-marie avant de parvenir à la cuve de perfusion. Le débit de perfusion est réglé à 3 ml/mn. Une heure avant l'expérimentation, les liquides de perfusion sont abondamment oxygénés. L'oxygénation est maintenue durant toute la perfusion par barbotage d'oxygène dans les récipients contenant les liquides de perfusion. En cours d'expérimentation, le changement de liquide de perfusion est réalisé à l'aide d'un robinet à 3 voies convenablement positionné. La contenance du circuit entre ce robinet et la cuve de perfusion étant de 1 ml, le temps de latence dans les changements de liquide est bref (15 à 20 secondes).

2 - Méthode d'enregistrement de l'activité électrique.

L'activité électrique transmembranaire est enregistrée par la méthode des microélectrodes fixes de CORABOEUF et WEIDMANN (1949a).

A. - Obtention des microélectrodes.

Les microélectrodes sont obtenues par étirement manuel d'un tube de verre de 3 mm de diamètre extérieur et de 80 mm de longueur environ, dont la partie médiane est chauffée à l'aide d'un micro-chalumeau. Les électrodes sont remplies selon la technique classique de l'ébullition sous vide par une solution de chlorure de potassium 3M. Le diamètre externe de la pointe est inférieure à 0,5 μ . La résistance des microélectrodes est mesurée par l'intermédiaire d'une boîte de résistances et d'une boîte de tarage. Seules les électrodes dont la résistance électrique est comprise entre 12 et 20 M Ω sont utilisées.

B. - Circuit d'enregistrement.

Le circuit d'enregistrement utilisé est celui de NASTUK et HODGKIN (1950) adapté aux préparations cardiaques par BRADY et WOODBURY (1956) et amélioré par de nombreux

auteurs (GARGOUIL, 1958; CORABOEUF, 1960; TRICOCHÉ, 1967). L'activité électrique est enregistrée à l'aide d'une électrode indifférente en argent chloruré (Ag-AgCl) introduite dans la cuve de perfusion et par une microélectrode fixée au bras d'un micromanipulateur. Sous contrôle d'une loupe binoculaire, la microélectrode est placée au voisinage immédiat de la préparation, puis introduite dans une cellule par déplacement vertical micrométrique. Le zéro électrique est obtenu lorsque la microélectrode est placée dans le bain de perfusion. L'activité électrique est dérivée par l'intermédiaire d'un changeur d'impédance, soit sur un oscilloscope Tektronix 502 A, soit sur un oscilloscope Tektronix à mémoire. Les phénomènes obtenus sont photographiés par une caméra (Alvar Cathomatic 35/1000) sur film Kodak microfilm ou sur film polaroid par une caméra Tektronix.

3 - Entraînement électrique.

L'entraînement électrique a été appliqué à des lambeaux ventriculaires ou à des préparations ne présentant plus d'activité spontanée à la suite de l'action de milieux de perfusion déséquilibrés ou de drogues. Les chocs électriques sont délivrés par un neuroexcitateur (H.S.E. 7801) et envoyés à une unité d'isolement. Deux fils d'argent de 100 μ de diamètre externe, isolés et assemblés par un vernis isolant gras relient l'unité d'isolement à la préparation et servent d'électrodes stimulatrices. L'extrémité des deux électrodes, non isolées sur la surface de leur section (soit environ 0,01 mm²) est placée au contact de la préparation à l'aide d'un micromanipulateur. Une dérivation des chocs électriques de stimulation est réalisée sur la deuxième voie de l'oscilloscope et permet d'avoir la trace des chocs.

L'ensemble du montage est représenté figure 21.

4 - Application de courants transmembranaires imposés.

Nous avons utilisé le montage de WEIDMANN (1951) modifié par GARGOUIL, TRICOCHÉ et BERNARD (1963). Cette technique, dérivée de celle qui a été proposée pour mesurer les variations de résistance de membrane myocardique, utilise deux microélectrodes. L'une d'elle permet l'application d'un courant hyperpolarisant ou dépolarisant, l'autre enregistre les variations du potentiel membranaire. L'utilisation de deux microélectrodes jumelées obtenues soit par étirement simultané de deux tubes de verre, soit par collage ne nous a pas paru satisfaisante dans le cas de notre matériel expérimental. De telles microélectrodes, lorsqu'elles ont un diamètre de pointe assez réduit pour permettre un empalement correct, présentent le plus souvent des potentiels de pointe élevés et entre elles des phénomènes de capacité. Nous avons préféré utiliser deux microélectrodes indépendantes (technique de WEIDMANN, 1961). Chacune d'elles est solidarisée au bras d'un micromanipulateur et amenée au voisinage immédiat de l'autre sous le contrôle d'un microscope stéréoscopique, à une distance variant de 50 à 70 μ environ. La pénétration de chaque électrode est suivie sur l'écran d'un oscilloscope; un in-

verseur placé à l'entrée du changeur d'impédance permet de contrôler au cours de l'expérimentation l'empalement des microélectrodes. Les résistances des électrodes utilisées varient de 14 à 20 M Ω pour les électrodes d'enregistrement et de 10 à 12 M Ω pour les électrodes de stimulation. Les électrodes ont été remplies par du chlorure de potassium 3M; l'emploi préconisé de citrate de potassium 1M pour le remplissage des électrodes stimulatrices n'ayant pas influé notablement sur la rectification due à la microélectrode a été abandonné. La figure 22 A montre les tracés de courants obtenus par une électrode stimulatrice passant les courants hyperpolarisants et dépolarisants de façon symétrique.

Le courant délivré par le choc de stimulation est mesuré aux bornes d'une résistance de 100 K Ω et dérivé sur la seconde voie de l'oscilloscope. La figure 22 B indique le schéma électrique du dispositif expérimental utilisé.

R E S U L T A T S

Première partie :

=====

A. - Différenciation du tissu myocardique en culture in vitro.

I - Evolution en culture in vitro du feuillet mésodermique isolé de l'aire cardiaque.

II - Influence de l'environnement tissulaire sur l'évolution du mésoderme pré-cardiaque en culture in vitro.

III - Conclusions.

B. - Activité électrique du tissu myocardique embryonnaire.

I - Activité électrique intracellulaire du myocarde embryonnaire.

II - Activité électrique du tissu myocardique différencié en culture in vitro par le mésoderme isolé de l'aire cardiaque.

III - Activité électrique des tubes cardiaques différenciés en culture in vitro en milieu liquide.

IV - Conclusions.

Les résultats faisant l'objet de cette première partie du travail concernent tout d'abord l'étude des potentialités de différenciation du mésoderme de l'aire cardiaque présomptive et de l'influence que peut exercer sur cette différenciation l'environnement tissulaire fourni au mésoderme.

Les caractéristiques électrophysiologiques des tissus cardiaques embryonnaires du poulet sont ensuite précisées, d'une part dans le cas de l'ontogenèse normale et d'autre part dans celui du tissu myocardique se différenciant en culture in vitro.

A. DIFFERENCIATION DU TISSU MYOCARDIQUE EN CULTURE IN VITRO.

=====

Les résultats obtenus par ORTS-LLORCA (1963) puis par ORTS-LLORCA et RUANO-GIL (1965) ont conduit ces auteurs à attribuer à l'endoderme un rôle inducteur spécifique dans la différenciation cardiaque. Ces auteurs séparent mécaniquement les feuillets endodermique ou ectodermique du feuillet mésodermique de l'aire cardiaque présomptive de l'embryon de poulet. L'absence de tube cardiaque du côté opéré de l'embryon est interprétée comme résultant du prélèvement de l'endoderme qui n'a pu exercer son action inductrice sur les cellules mésodermiques précardiaques.

Ces résultats n'apparaissent pas très concluants. En effet, à ces stades du développement, l'endoderme de l'aire cardiaque est très adhérent au mésoderme de cette région. Il est impossible d'arracher mécaniquement l'endoderme sans entraîner avec lui la plus grande partie des cellules du mésoderme splanchnique destinées à former le coeur. Dans ces conditions, l'absence de tube cardiaque du côté opéré du blastoderme résulte davantage de l'absence de matériel mésodermique que de l'absence d'induction endodermique.

Par contre, la méthode de dissociation par action de la trypsine adaptée par N. LE DOUARIN (1964) aux feuillets embryonnaires de jeunes blastoderms a permis à G. LE DOUARIN, N. LE DOUARIN et CUMINGE (1965) d'obtenir à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque présomptive placé en greffe coelomique, la différenciation de tissu myocardique contractile. Pour ces auteurs, ce résultat montre que le mésoderme, dès le stade du prolongement céphalique, est capable de s'autodifférencier en tissu myocardique fonctionnel lorsqu'il est placé dans les conditions de nutrition réalisées par la greffe coelomique.

Il nous a paru intéressant de continuer cette étude pour analyser, dans les conditions de la culture in vitro, les potentialités de différenciation du mésoderme de l'aire cardiaque présomptive.

I. - Evolution en culture *in vitro* du feuillet mésodermique isolé de l'aire cardiaque.

Les expériences sont faites sur des embryons de poulet de stades échelonnés du prolongement céphalique à trois somites. Le feuillet mésodermique est isolé de l'ectoderme et de l'endoderme de l'aire cardiaque présomptive par action de la trypsine (Fig. 20).

1 - Culture du feuillet mésodermique sur milieu gélosé.

Le feuillet mésodermique isolé est placé en culture *in vitro* selon la méthode de WOLFF et HAFFEN (1952).

L'explant régularise ses contours puis il se forme un nodule central net d'aspect plus compact, bien visible généralement après 24 heures de culture. La différenciation du tissu myocardique spontanément contractile est obtenue dans 20 % des cas environ (sur 48 cas) sur le milieu "standard".

L'activité spontanée persiste pendant 3 à 4 jours, puis l'explant s'aplatit, le nodule central se désorganise et la culture se nécrose.

Le milieu gélosé "enrichi" dérivant du milieu "standard" par substitution du sérum de poulain au liquide de Tyrode se montre plus favorable à la différenciation du tissu myocardique et au maintien de sa survie. La proportion d'explants présentant des contractions spontanées obtenue sur ce milieu est d'environ 40 % (sur 104 cas).

Il nous a paru intéressant de rechercher des conditions de culture permettant d'obtenir une meilleure différenciation du tissu myocardique et une survie prolongée avec persistance de l'activité physiologique spontanée de l'explant. L'utilisation d'un milieu liquide nous a permis d'aboutir à ce résultat.

2 - Culture du mésoderme précardiaque en milieu liquide.

Nous avons utilisé le milieu de croissance de RINALDINI (1959) préconisé par cet auteur pour la culture de cellules cardiaques isolées. Quel que soit le stade de développement atteint par l'embryon au moment du prélèvement, l'évolution du mésoderme précardiaque est remarquablement identique dans tous les cas observés. Après quelques heures de culture (6 à 8 heures), les explants régularisent leurs

contours et s'épaississent. La croissance se poursuit pendant 24 heures environ, l'explant devenant sphérique. L'apparition des battements spontanés se produit après 12 à 18 heures de culture dans la quasi totalité des cas. Le changement quotidien du milieu de culture permet de conserver l'activité spontanée des explants pendant une longue période, de trois semaines à un mois.

L'examen histologique (Fig. 23 A) montre que les myoblastes forment des travées irrégulièrement concentriques constituant un tissu compact dépourvu de cavité centrale. Une couche cellulaire périphérique d'aspect épithélial limite l'explant, ce qui s'observe de façon générale dans les conditions de la culture organotypique (WOLFF, 1952).

Le milieu liquide utilisé se montre donc plus favorable que le milieu gélosé à la différenciation du mésoderme précardiaque et au maintien de l'activité spontanée, à la condition essentielle d'effectuer un repiquage journalier dans un milieu frais. Il est intéressant de noter que lorsque le milieu n'est pas renouvelé les battements de l'explant cessent en 36 heures environ. L'activité spontanée peut reprendre lorsque l'explant est transféré dans un milieu frais. De même, les explants en survie ne présentant plus d'activité spontanée, retrouvent leur automatisme lorsqu'ils sont placés dans du liquide de Tyrode. Cette réapparition de l'automatisme ne peut être obtenue en ajoutant au milieu du sérum de poulain ou de l'extrait embryonnaire. La cessation des contractions après 24 à 36 heures de culture dans un milieu résulte non pas d'un épuisement en substances nutritives de ce milieu, mais d'un déséquilibre de la balance ionique.

Il est donc possible de conclure des résultats obtenus que les cellules mésodermiques précardiaques peuvent, dès un stade précoce du développement, former par autodifférenciation les myoblastes cardiaques. Cependant, en culture in vitro, cette différenciation cellulaire ne s'accompagne pas d'une morphogenèse et d'une histogenèse normales.

DE HAAN (1964) par une étude cinématographique a montré que les cellules mésodermiques de l'aire cardiaque, situées latéralement dans le blastoderme, migrent sur l'endoderme vers le repli cardiaque; le feuillet endodermique semble orienter et guider cette migration cellulaire.

Le tissu myocardique différencié à partir du mésoderme précardiaque isolé ne s'organisant pas en un coeur tubulaire, cette observation posait le problème du rôle des autres feuillets de l'aire cardiaque sur la morphogenèse du coeur.

II. - Influence de l'environnement tissulaire sur l'évolution du mésoderme précardiaque en culture in vitro.

L'autodifférenciation du mésoderme précardiaque isolé et placé en culture in vitro s'accompagne d'une prolifération cellulaire importante, aboutissant à la formation d'un tissu myocardique compact.

EKMAN (1921, 1925) en explantant l'ébauche cardiaque et son revêtement ectodermique dans du liquide de Ringer obtient chez deux batraciens (Rana fusca et Bombinator) la formation de tubes cardiaques contractiles. L'organogenèse cardiaque reste malgré tout très limitée dans ces fragments embryonnaires cultivés in vitro.

Une certaine évolution du tube cardiaque formé in vitro a été obtenue par BACON (1945) à partir de jeunes ébauches cardiaques d'amblystome. Le milieu de culture utilisé (liquide de Holfreter dilué) ne permet pas un maintien de l'activité spontanée au-delà de 7 jours.

Plus récemment, BRIDE (1965) puis BRIDE et GOMOT (1967) ont étudié la différenciation in vitro de l'ébauche cardiaque de l'embryon de Rana temporaria prélevée aux stades 16 et 17 de la table de SHUMWAY (1940) et placée en culture in vitro sur un milieu gélosé dérivé du milieu "enrichi" de WOLFF et HAFFEN (1952). L'histogenèse et la morphogenèse cardiaques obtenues sont proches de la normale, mais ces expériences concernent des stades relativement avancés du développement cardiaque, puisque les battements cardiaques apparaissent au stade 19 de la table de développement de SHUMWAY.

Nous nous sommes demandés, bien qu'en l'absence d'un support épithélial la différenciation du myocarde spontanément pulsatile est possible, si un tel support n'était pas indispensable à la réalisation de la morphogenèse et de l'histogenèse cardiaques chez l'embryon de poulet.

1 - Evolution en culture *in vitro* de l'aire cardiaque présomptive.

L'aire cardiaque présomptive est prélevée chez des embryons de stades s'échelonnant du prolongement céphalique à 3 somites. Dans certains cas nous avons utilisé des embryons de stade 4 et 5 somites. L'aire cardiaque est placée en culture *in vitro* sans dissociation des feuillets.

L'évolution des explants varie selon que la culture est réalisée sur milieu gélosé ou en milieu liquide.

a.) Culture en milieu liquide.

L'évolution des 86 explants de cette série expérimentale est identique quel que soit le stade de l'embryon donneur. Après 3 à 4 heures de culture, l'explant tend à former une vésicule constituée par les feuillets ectodermique et endodermique doublés d'un mince feuillet de cellules mésodermiques. A l'intérieur de la vésicule, les cellules mésodermiques précardiaques se condensent dans la région antéro-interne de l'aire cardiaque. Nous avons étudié cette localisation dans 26 cas grâce à un marquage de l'aire cardiaque par des grains de charbon animal ou d'oxyde de fer. La migration des cellules mésodermiques s'effectue donc dans la direction normale, puisque chez l'embryon de poulet de ce stade les cellules précardiaques des aires présomptives bilatérales convergent vers le repli cardiaque transverse. Cette migration s'effectue au contact du feuillet endodermique, le feuillet ectodermique se délaminant des deux autres feuillets après deux à trois heures de culture. Un tube cardiaque animé de contractions spontanées dont le rythme varie de 30 à 60 battements par minute s'organise ainsi progressivement. Ce tube réalise un début d'organogenèse se manifestant par une double courbure et des constriction (Fig. 23 B). Les contractions apparaissent après environ 12 heures de culture. Elles se manifestent tout d'abord au niveau de la chambre postérieure du tube cardiaque, puis l'onde contractile gagne les autres chambres du tube. L'examen histologique (Fig. 23 C) permet d'observer une histogenèse comparable à celle du coeur normal aux jeunes stades. En effet, le tube cardiaque est constitué d'un épimyocarde mince formé de trois à quatre couches de cellules et séparé par un espace anhiste d'un mince feuillet endocardique aux cellules aplaties. Les différentes régions du tube cardiaque communiquent entre elles comme le font les chambres sino-atriale, ventriculaire et bulbaire du coeur normal.

b.) Culture sur le milieu gélosé.

Nous avons suivi l'évolution de 60 explants dans ces conditions expérimentales. L'évolution morphologique des aires cardiaques présomptives explantées est plus ou moins rapide selon le stade de développement atteint par l'embryon donneur. Un décalage d'environ 12 heures est observé dans l'apparition des contractions entre des aires cardiaques provenant d'embryons au stade de 4 et 5 somites et celles prélevées chez des embryons présomitiques et aux stades de 1 à 3 somites.

L'évolution des explants montre deux différences essentielles avec les résultats obtenus en milieu liquide. En premier lieu il ne se constitue pas un véritable tube cardiaque, mais une série de vésicules dont la disposition est variable selon les cas et qui ne communiquent pas toujours entre elles. En second lieu, ces vésicules sont constituées, comme précédemment, par un tissu formé de quelques couches de cellules, mais l'endocarde ne se différencie pas (Fig. 23 D). L'intérieur de ces vésicules est occupé par un coagulum anhiste.

Il apparaît donc que lorsque le mésoderme de l'aire cardiaque n'est pas séparé de l'endoderme et de l'ectoderme il tend à s'organiser en une formation creuse à paroi mince. L'évolution obtenue est donc plus proche de l'organogenèse cardiaque normale que lorsque le feuillet mésodermique est cultivé seul. Par ailleurs, le milieu liquide est à ce point de vue nettement plus favorable à la différenciation du tube cardiaque que ne l'est le milieu gélosé.

La question se posait alors de savoir si le feuillet endodermique de l'aire cardiaque jouait un rôle spécifique sur la migration des cellules précardiaques et l'histogenèse du coeur tubulaire.

Pour répondre à cette question nous avons cultivé, en milieu liquide, le mésoderme laissé en contact soit avec l'endoderme, soit avec l'ectoderme.

2 - Influence de l'endoderme sur la différenciation du mésoderme précardiaque.

L'aire cardiaque présomptive prélevée est soumise à l'action de la trypsine et le feuillet ectodermique est éliminé. Les explants sont cultivés dans le milieu liquide de RINALDINI.

a.) Evolution du mésoderme précardiaque cultivé au contact de l'endoderme de l'aire cardiaque.

Deux à trois heures après la mise en culture, l'endoderme se replie et englobe le mésoderme. Les bords du feuillet endodermique se rejoignent et se soudent. Le mésoderme évolue ainsi dans une vésicule. Pour les 72 explants de cette série expérimentale, l'observation après 24 heures de culture montre que les cellules mésodermiques se sont organisées en un tube recourbé présentant des contractions. Les battements apparaissent après 12 à 16 heures de culture. Les différentes cavités délimitées par des contractions, communiquent entre elles (Fig. 24 A). Toutefois la morphogenèse s'éloigne du type normal car des excroissances apparaissent à la surface du tube. L'endocarde se constitue et est formé de cellules aplaties.

Par conséquent, l'absence de l'ectoderme de la région cardiaque n'empêche pas la morphogenèse et l'histogenèse cardiaques de se manifester. L'englobement du mésoderme par le feuillet endodermique supplée à l'absence du feuillet ectodermique.

Ce résultat posait un nouveau problème. Le revêtement épithélial endodermique doit-il obligatoirement appartenir à l'aire cardiaque présomptive ou un épithélium endodermique prélevé en dehors de ce territoire embryonnaire permet-il d'obtenir un résultat analogue ?

Pour répondre à cette question, le mésoderme précardiaque préalablement isolé a été associé sur milieu gélosé à un fragment d'endoderme provenant de la région postérieure du blastoderme. Lorsque l'association est réalisée, après quelques heures de contact, l'explant est transféré en milieu liquide.

b.) Evolution du mésoderme précardiaque cultivé au contact d'un feuillet endodermique prélevé en dehors de l'aire cardiaque.

Le feuillet endodermique est prélevé dans la région postérieure du blastoderme d'un embryon de même stade de développement que celui qui fournit le mésoderme précardiaque, ou sur un embryon de deux jours d'incubation. Dans les deux cas l'évolution est analogue.

Dans 30 cas sur les 35 associations réalisées, le feuillet endodermique a englobé le mésoderme. Les 5 associations qui ont échoué résultent de ce que le feuillet endodermique avait une surface inférieure à celle du feuillet mésodermique qui lui était associé.

Après 30 à 48 heures de culture en milieu liquide, l'endoderme a formé une vésicule dans laquelle on distingue une formation tubulaire présentant des courbures et des constrictiones et animée de battements spontanés. Cependant, les courbures et les constrictiones des tubes cardiaques ainsi formés ont des positions variables d'un explant à l'autre et s'éloignent du type normal.

L'examen histologique (Fig. 24 B) montre une large vésicule formée par l'endoderme doublée intérieurement par un mince feuillet mésodermique et dans laquelle les cellules mésodermiques se sont organisées en une structure tubulaire creuse, localisée à un pôle de la vésicule endodermique. La position du tube cardiaque sur la paroi de la vésicule est variable d'un explant à l'autre. L'épimyocarde est mince, constitué de quelques couches cellulaires. L'endocarde ne se différencie pas dans tous les cas. Cependant dans 16 explants, l'épimyocarde est séparé par un espace anhiste d'un feuillet endocardique constitué de cellules aplaties.

L'association d'un feuillet épithélial endodermique prélevé en dehors de l'aire cardiaque avec le mésoderme cardiaque permet donc, à des degrés divers, une différenciation histogénétique du tube cardiaque.

Le fait que l'histogenèse et la morphogenèse cardiaques puissent se réaliser en présence du seul feuillet endodermique nous ont conduits à rechercher si cette évolution pouvait être réalisée de la même façon en plaçant, au contact du mésoderme précardiaque un feuillet ectodermique.

3 - Influence de l'ectoderme sur la différenciation du mésoderme précardiaque.

Comme dans les expériences précédentes, l'aire cardiaque est prélevée puis le feuillet endodermique est éliminé après action de la trypsine. Les explants

sont placés en culture dans le milieu liquide.

a.) Evolution du mésoderme précardiaque cultivé au contact de
l'ectoderme de l'aire cardiaque.

Après quelques heures de culture, pour les 48 explants réalisés, l'ectoderme se replie sur le feuillet mésodermique et l'englobe. La vésicule ectodermique est doublée intérieurement d'un mince feuillet mésodermique et le mésoderme précardiaque forme une structure tubulaire avec des courbures qui sont d'ailleurs morphologiquement variables selon les cas. Le tube cardiaque présente des battements spontanés après 18 à 24 heures de culture.

L'examen histologique (Fig. 24 C) montre un épimyocarde fréquemment lacunaire et l'endocarde n'a pu être observé que dans 7 cas sur les 31 explants fixés en vue de l'histologie.

Le rôle de l'endoderme sur lequel s'effectue normalement la migration des cellules précardiaques n'est pas à cet égard spécifique, puisqu'en présence du feuillet ectodermique de l'aire cardiaque le mésoderme évolue en une formation tubulaire.

Un résultat comparable peut-il être obtenu en cultivant le mésoderme précardiaque au contact d'un épithélium ectodermique prélevé en dehors du territoire cardiaque présomptif ?

b.) Evolution du mésoderme précardiaque cultivé au contact d'un
ectoderme prélevé en dehors de l'aire cardiaque.

Le mésoderme précardiaque est isolé par action de la trypsine et associé sur un milieu gélosé à un fragment d'ectoderme prélevé dans la région postérieure du blastoderme d'un embryon au même stade ou de 2 jours d'incubation.

Les résultats obtenus dépendent des rapports qui s'établissent sur le milieu gélosé entre les deux feuillets. En effet, l'ectoderme de la région postérieure du jeune blastoderme tend à s'enrouler sur lui-même et à se rétracter.

Il offre donc souvent une surface inférieure à celle du mésoderme cardiaque qui lui est associé. Sur 16 associations de ce type, 9 seulement ont permis un englobement du feuillet mésodermique par l'ectoderme après transplantation dans le milieu liquide.

L'association du mésoderme cardiaque avec un feuillet ectodermique provenant d'un embryon plus âgé se montre plus favorable à l'évolution du feuillet mésodermique, l'ectoderme prélevé pouvant offrir une surface de contact nettement supérieure à celle du mésoderme cardiaque. Dans 15 cas sur 18 de cette série expérimentale, le mésoderme a été englobé par l'ectoderme.

Lorsque l'englobement du feuillet mésodermique est réalisé, quel que soit le stade de développement atteint par l'embryon donneur du feuillet ectodermique, l'évolution du mésoderme est très homogène. L'englobement est réalisé après 18 à 24 heures de culture en milieu liquide et le mésoderme évolue dans une vésicule. A l'issue de 36 à 48 heures de culture, l'observation macroscopique permet de distinguer une structure vésiculaire ou tubulaire, de volume réduit, présentant des contractions rythmiques. Toutefois, il convient de noter que cette vésicule (ou ce tube) ne présente pas les constriction et les courbures d'un tube cardiaque normal.

La figure 24 D montre l'aspect histologique d'un explant de cette série expérimentale. L'ectoderme constitue une vaste vésicule doublée d'un mince revêtement de cellules mésodermiques. Le mésoderme cardiaque a formé une structure tubulaire creuse présentant un épimyocarde mince, formé de 3 à 5 couches de cellules. Dans aucun cas sur les 16 explants fixés en vue de leur examen histologique, nous n'avons pu observer une différenciation endocardique.

Dans cette série expérimentale certains explants présentent une évolution intéressante à mentionner : lorsque le feuillet épithélial n'englobe pas le mésoderme précardiaque au début de la culture en milieu liquide, le mésoderme se condense à une extrémité de l'association et forme un amas cellulaire sphérique qui reste en relation avec la vésicule formée à partir de l'épithélium (Fig. 24 E). Le volume de cet amas cellulaire reste, dans tous les cas, nettement inférieur

à celui d'un explant provenant du feuillet mésodermique cultivé isolément. D'autre part, le mésoderme limité par une assise de cellules d'aspect épithélial reste lacunaire, lâche, mais ne présente pas de cavité centrale bien délimitée. Les contacts établis lors de l'association sur milieu gélosé semblent avoir limité la prolifération cellulaire du mésoderme précardiaque. Cette observation nous amène à conclure à l'existence d'une sorte de compétition entre la prolifération cellulaire d'une part, l'histogenèse et l'organogenèse d'autre part.

III. - Conclusions.

De ces résultats, il apparaît que chez l'embryon de poulet l'autodifférenciation in vitro du mésoderme précardiaque en tissu myocardique contractile est possible dès le stade du prolongement céphalique. L'endoderme n'a donc pas un rôle inducteur pour cette différenciation, du moins à partir des stades étudiés. La détermination des cellules mésodermiques cardiaques doit même être antérieure au stade du prolongement céphalique puisque G. LE DOUARIN (1965) a observé, à ce stade, l'existence de myofilaments d'actine de 50 Å de diamètre. Dès ce stade, la cytodifférenciation des futures cellules myocardiques a débuté et comme le montrent les expériences de culture in vitro, l'achèvement de la différenciation ne requiert pas la présence de l'endoderme comme le pensaient ORTS-LLORCA (1963) et ORTS-LLORCA et RUANO-GIL (1965). L'origine de la détermination du mésoderme précardiaque chez les Vertébrés supérieurs demeure donc un problème non résolu. Par ailleurs, nos résultats n'excluent pas un rôle de l'endoderme dans la migration normale des cellules du mésoderme précardiaque vers le repli cardiaque. La capacité précoce d'autodifférenciation du mésoderme précardiaque ne semble pas limitée aux embryons d'Oiseaux puisque G. LE DOUARIN et NANOT (1967) ont obtenu du tissu myocardique contractile à partir du mésenchyme précardiaque de souris explanté dès un stade jeune correspondant au tout début de l'apparition des somites.

La technique de culture en milieu liquide présente l'avantage d'une longue survie permettant la persistance prolongée de l'activité physiologique spontanée du tissu myocardique.

Si la formation à partir du mésoderme de l'aire cardiaque présomptive d'un tissu myocardique battant spontanément ne requiert pas la présence des feuillets endodermique ou ectodermique, cette autodifférenciation s'accompagne in vitro et surtout dans le milieu liquide de culture, d'une prolifération cellulaire importante, mais ne comporte pas une évolution histogénétique et morphogénétique normale. La structure myocardique de l'explant est compacte et dépourvue de cavité centrale.

La formation d'un coeur tubulaire s'accomplit si le mésoderme évolue au contact d'un feuillet épithélial sans qu'il existe à cet égard un rôle spécifique de l'endoderme de l'aire cardiaque. En effet, la formation d'une structure tubulaire myocardique peut être obtenue lorsque le mésoderme précardiaque est expérimentalement associé à des lambeaux de feuillets épithéliaux d'origines variées. Cependant, l'histogénèse et la morphogénèse cardiaques in vitro sont d'autant plus proches de la normale que les rapports tissulaires de l'aire cardiaque sont conservés.

Des expériences d'association du mésoderme précardiaque avec des épithéliums étrangers de l'aire cardiaque, il ressort qu'il est possible d'orienter l'évolution histogénétique du mésoderme. En présence d'un support épithélial ectodermique ou endodermique, prélevé en dehors de l'aire cardiaque, le mésoderme évolue en une formation tubulaire ou vésiculaire.

En fait, la nature cellulaire du support fourni au mésoderme n'est pas indispensable à l'élaboration d'une structure tubulaire ou vésiculaire. Des expériences récentes entreprises au laboratoire montrent (SUIGNARD, 1973) qu'un film de collagène coulé sur le fond des récipients de culture oriente l'évolution histogénétique et morphogénétique du mésoderme précardiaque qui lui est associé. Ainsi, le mésoderme de l'aire cardiaque présomptive d'embryons de stades échelonnés de 3 à 5 somites placé en culture en milieu liquide sur un film de collagène, évolue en une structure vésiculaire creuse. Le tissu myocardique pulsatile constituant l'épimyocarde est mince et séparé de la gelée cardiaque par un feuillet endocardique continu.

Lorsque les conditions expérimentales provoquent l'organisation d'une structure creuse, la paroi myocardique reste mince, formée de quelques couches cellulaires.

Il apparaît donc que le contact entre le mésoderme précardiaque et un feuillet épithélial freine la prolifération cellulaire au profit de l'organogenèse et de l'histogenèse cardiaques. Au contraire, les cellules du feuillet mésodermique précardiaque cultivé seul prolifèrent activement, mais sans organisation histogénétique et organogénétique. Ces deux résultats mettent en évidence l'existence d'une compétition entre deux phénomènes : prolifération cellulaire d'une part, histogenèse et organogenèse d'autre part.

Il est intéressant de noter que, lorsque l'englobement du feuillet mésodermique par le revêtement épithélial ne se réalise pas (Fig. 24 E), la prolifération cellulaire du mésoderme, bien qu'inférieure à celle qui est observée lorsque le feuillet mésodermique est cultivé seul, est plus importante que lorsque le mésoderme évolue à l'intérieur d'une vésicule épithéliale.

L'ensemble de ces expériences permet de mieux comprendre le développement cardiaque normal. Il est vraisemblable que les feuillets de l'aire cardiaque n'exercent pas, aux stades considérés, une action inductrice sur la différenciation cellulaire du myocarde, mais orientent l'évolution histogénétique et l'organogenèse aboutissant à la formation du tube cardiaque.

B. ACTIVITE ELECTRIQUE DU TISSU MYOCARDIQUE EMBRYONNAIRE.

=====

Les premiers travaux concernant l'activité électrique globale du coeur embryonnaire de poulet datent de 1913. WERTHEIM-SALOMONSON (1913) fut le premier à enregistrer l'électrogramme global du coeur embryonnaire de poulet de 60 heures d'incubation. La technique utilisée et en particulier le manque d'amplification n'a pas permis à cet auteur de donner une interprétation des tracés. A la suite de ces travaux, CLUZET et SARVONAT (1914), puis KULBS (1920),

SPADOLINI et GIORGIO (1921) ont montré que l'onde P et le complexe QRST pouvaient être obtenus sur des coeurs embryonnaires de poulet après 50 à 72 heures d'incubation.

Si l'activité électrique globale du coeur embryonnaire de poulet a été connue très tôt, par contre son activité électrique transmembranaire n'est connue que depuis 20 ans et seulement depuis 10 ans en ce qui concerne les stades jeunes.

Les travaux de G. LE DOUARIN, OBRECHT et CORABOEUF (1964) ont permis de préciser les caractéristiques électrophysiologiques des différentes régions anatomiques du coeur embryonnaire de poulet de 3 et 4 jours d'incubation maintenu en survie par la technique de culture organotypique de WOLFF et HAFFEN (1952). Ces auteurs ont montré la stabilité des caractéristiques des potentiels d'action intracellulaires des différentes régions anatomiques du coeur embryonnaire en culture sur milieu gélosé.

Nous avons poursuivi une étude électrophysiologique du coeur embryonnaire de poulet à différents stades du développement en nous référant aux caractéristiques électrophysiologiques des différentes parties anatomiques du coeur de 4 jours d'incubation. Les résultats rapportés ici ne concerneront que les stades retenus pour l'expérimentation ultérieure.

I. - Activité électrique intracellulaire du myocarde embryonnaire.

Les enregistrements ont été effectués sur des coeurs d'embryons de poulet au 2ème jour d'incubation (stade de 18 à 25 somites) au 3ème jour (stade de 25 à 35 somites) au 4ème jour (stade de 35 à 45 somites) et sur des lambeaux ventriculaires de coeur d'embryons de 19 jours d'incubation.

1 - Les potentiels d'action du coeur embryonnaire au 2ème jour d'incubation.

Selon la région du coeur interrogée, les potentiels d'action enregistrés sont de deux types différents (Fig. 25 A).

a.) Dans la région atriale, les P.A. sont triangulaires et la diastole présente une pente de dépolarisation signant le caractère automatique de cette région. La phase ascendante est lente (6,4 V/s) ; l'amplitude de ces P.A. est faible (50 à 60 mV). Le potentiel membranaire de repos est environ de 40 à 45 mV.

b.) Le P.A. ventriculaire présente une phase ascendante plus lente que celle du P.A. auriculaire (5,8 V/s). Sa repolarisation se fait en deux temps : une repolarisation lente qui confère à ce P.A. un aspect rectangulaire, suivie d'une phase de repolarisation plus rapide qui ramène la membrane à son potentiel de repos. La diastole est isopotentielle. La durée du P.A. est environ de 240 ms (Fig. 24 A). Lorsque la région ventriculaire interrogée est proche de la région atriale, il est possible d'enregistrer une diastole présentant une légère pente de dépolarisation due à une conduction décrémente de l'activité automatique atriale. La polarisation membranaire de repos est faible (50 à 55 mV) ; l'amplitude du P.A. varie de 60 mV à 80 mV dans les meilleurs cas.

Les valeurs des potentiels membranaires de repos indiquées ici sont entachées vraisemblablement d'une part d'erreur du fait de la difficulté que présentent aux jeunes stades les empilements cellulaires. La faible taille des cellules d'une part, l'épaisseur réduite de l'épimyocarde d'autre part, rendent difficile l'étude de cette préparation.

2 - Les potentiels d'action du coeur embryonnaire de 3 jours d'incubation.

L'activité électrique transmembranaire présente plusieurs différences par rapport à celle du coeur de deux jours.

La vitesse des phases de dépolarisation tant des P.A. atriaux que ventriculaires bien qu'encore lente s'accélère par rapport aux stades antérieurs et atteint respectivement 12 V/s et 13,6 V/s (Fig. 25 C). Les durées des P.A. diminuent. Ceci est particulièrement net dans le cas des P.A. ventriculaires dont la durée est en moyenne de 220 ms. La diastole de ceux-ci est toujours isopotentielle. Le potentiel membranaire de repos varie de 55 à 65 mV.

L'amplitude des P.A. est plus élevée à ce stade que chez le coeur des embryons de 2 jours d'incubation. Les valeurs obtenues peuvent atteindre 60 à 70 mV pour les P.A. atriaux et 90 mV pour les P.A. ventriculaires.

3 - Les potentiels d'action du coeur embryonnaire de 4 jours d'incubation.

La figure 8 A montre l'aspect des potentiels d'action intracellulaires des diverses parties du coeur embryonnaire de 4 jours.

Au niveau de l'atrium, on observe deux types de potentiels. Près de la région sinusale, on note une dépolarisation diastolique plus ou moins accentuée. Dans les régions atriales éloignées du sinus, cette dépolarisation n'existe plus, ce qui montre que le centre d'automatisme est localisé au sinus qui s'est incorporé au tube cardiaque vers le stade de 25 à 30 somites et est fonctionnel au stade de 35 à 40 somites (PATTEN et KRAMER, 1933). Le ventricule et le bulbe artériel fournissent des P.A. de type "rectangulaire", les vitesses des phases de repolarisation étant plus faibles dans le cas du bulbe.

A ce stade, les vitesses de dépolarisation des P.A. sont rapides (17,7 V/s, Fig. 25 C). Les amplitudes des P.A. varient selon leur nature. Les P.A. atriaux atteignent 80 à 90 mV, les P.A. ventriculaires 80 à 110 mV. Les P.A. sont moins durables que précédemment ; le P.A. atrial dure environ 180 ms et le P.A. ventriculaire 210 ms. Le P.M.R. est d'environ 60 à 80 mV.

4 - Potentiels d'action du lambeau ventriculaire de 19 jours d'incubation.

Sur le coeur embryonnaire de ce stade, seule l'activité électrique ventriculaire a été enregistrée. L'activité électrique cellulaire induite par des chocs électriques appliqués à la préparation est de grande amplitude. L'amplitude des P.A. est de 90 à 120 mV (Fig. 8 B), leur durée est plus brève que dans le coeur d'un embryon de 4 jours et varie de 190 ms à 200 ms pour un rythme imposé de 1 choc par seconde. La vitesse de la phase ascendante du P.A. est rapide (37 V/s), supérieure à celle du P.A. ventriculaire de 4 jours (Fig. 25 C). La diastole est

isopotentielle ; le potentiel membranaire de repos varie de 65 à 85 mV selon les empacements.

Connaissant la morphologie des activités électriques à plusieurs stades du développement, nous avons entrepris l'étude des préparations de tissu myocardique différencié in vitro. Les travaux de G. LE DOUARIN, OBRECHT et CORABOEUF (1965, 1966) ont montré, sur des fragments de l'aire cardiaque présumptive de l'embryon de poulet explantés in vitro et différenciés en vésicules contractiles, que le rythme des battements et surtout les caractéristiques de l'activité électrique cellulaire diffèrent selon le niveau de l'aire cardiaque auquel le fragment a été prélevé (Fig. 2).

Nous avons recherché si l'explantation du mésoderme de l'aire cardiaque en milieu liquide nous permettrait de retrouver les divers types de P.A. décrits dans les expériences de fragmentation de G. LE DOUARIN, OBRECHT et CORABOEUF (1965, 1966) et si l'on assistait à une évolution de ces potentiels en fonction du temps de culture.

II. - Activité électrique du tissu myocardique différencié en culture in vitro par le mésoderme isolé de l'aire cardiaque.

L'aire cardiaque présomptive prélevée en totalité (feuillet ectodermique, mésodermique et endodermique) et cultivée in vitro sur milieu gélosé fournit du tissu myocardique dans lequel se différencient les trois catégories cellulaires du myocarde, c'est-à-dire les cellules atriales, ventriculaires et bulbaires reconnaissables par les caractéristiques de leurs potentiels d'action. Nous nous sommes demandés si les différentes catégories cellulaires du myocarde pouvaient être reconnues dans le tissu myocardique différencié à partir du seul feuillet mésodermique de l'aire cardiaque présomptive.

Le mésoderme de l'aire cardiaque présomptive est prélevé chez des embryons de stades présomitiques à trois somites et explanté dans le milieu liquide de RINALDINI. Après 20 à 22 heures de culture, le milieu de culture est renouvelé

quelques heures avant l'expérimentation. Après ce temps de culture, les explants présentent des contractions rythmiques spontanées.

Après 24 heures de culture, l'amplitude des P.A. des cellules myocardi-ques atteint 80 à 90 mV. La durée de ces P.A. est en moyenne de 280 ms.

Après 10 jours de culture, l'amplitude des P.A. est environ de 100 mV et peut atteindre, dans les meilleurs cas, 120 mV. Cette différence d'amplitude des P.A. entre les premiers jours de culture et un long temps de culture peut résulter de la difficulté de pénétration des microélectrodes dans les cellules des explants jeunes. Il est donc difficile de conclure avec certitude à une augmentation de l'amplitude des P.A. avec le temps de culture. La vitesse de la phase ascendante est lente, d'environ 4,7 V/s (Fig. 25 C).

Sur plus de cent explants explorés, tous les tracés que nous avons pu obtenir sont de type "rectangulaire", semblables aux P.A. des cellules ventriculaires du coeur de 3 jours.

Entre le premier et le 5ème jour de culture, deux types de P.A. ventriculaires sont enregistrés : les uns ont une diastole isopotentielle, tandis que les autres, correspondant à la région de l'explant où naît l'onde excito-motrice, possèdent les caractéristiques de l'automatisme : ils présentent une phase de dépolarisation lente diastolique et un prépotentiel (Fig. 26). Aux premiers jours de culture, il est difficile d'obtenir ces potentiels caractéristiques de l'automatisme. Ceci tend à montrer que le centre d'automatisme de l'explant est limité à un nombre de cellules relativement restreint.

Après 5 jours de culture, l'automatisme se généralise et une exploration systématique de l'explant montre que les P.A. présentent toujours une pente de dépolarisation lente diastolique due à la conduction décrémenteille du prépotentiel des cellules "pace-maker". Sur des fragments atriaux de coeur embryonnaire de poulet de 3 à 4 jours d'incubation explantés en culture organotypique, CORABOEUF, G. LE DOUARIN et OBRECHT (1965), avaient observé un tel résultat, c'est-à-dire une généralisation à l'ensemble de l'explant cultivé 4 à 5 jours, des caractéristiques électriques de l'automatisme.

Les résultats obtenus montrent que toutes les catégories cellulaires ne se différencient pas dans nos conditions expérimentales lorsque le tissu myocardique provient de la différenciation in vitro du mésoderme de l'aire cardiaque présumptive explanté isolément.

Rappelons que lorsque la région du blastoderme comprenant l'aire cardiaque est explantée en totalité (c'est-à-dire lorsque l'explant comprend les trois feuillets) sur le milieu gélosé de WOLFF et HAFFEN, la croissance du mésoderme est limitée et, bien que l'organogenèse et l'histogenèse restent rudimentaires, des vésicules myocardiques à parois minces apparaissent (G. LE DOUARIN, OBRECHT et CORABOEUF, 1965-1966). Dans ces conditions de culture, ces auteurs ont montré que les différentes catégories cellulaires du myocarde se différencient.

Lorsque l'aire cardiaque totale ou le feuillet mésodermique laissé au contact d'un support épithélial sont cultivés en milieu liquide, nous avons précédemment montré que la prolifération cellulaire est inhibée et un tube cardiaque aux parois minces se forme.

La question se posait alors de savoir si dans ces conditions expérimentales qui favorisent l'organogenèse cardiaque au détriment de la prolifération des cardiomyoblastes les différentes catégories cellulaires du myocarde pouvaient se différencier. Les critères électrophysiologiques ont permis de répondre à cette question.

III. - Activité électrique des tubes cardiaques différenciés en culture in vitro en milieu liquide.

Après 18 à 24 heures de culture, les tubes cardiaques différenciés sont spontanément contractiles. La vésicule formée à partir des feuillets épithéliaux est alors incisée diamétralement à l'aide des ciseaux de Pascheff-Wolff, dans du liquide de Tyrode. Les lèvres de l'incision sont tendues et fixées sur un fond d'élastomère (silicones Rhodorsil - Rhône Poulenc RTV 141) par des fils d'argent. L'ensemble élastomère - tube cardiaque est fixé au fond de la cuve à perfusion et porté dans le bain-marie thermostaté à 38° C.

Les résultats obtenus sont identiques pour les tubes cardiaques différenciés à partir de l'aire cardiaque totale, et pour ceux qui sont formés à partir du mésoderme laissé au contact de l'un des feuillets épithéliaux ou associé à un support épithélial prélevé en dehors de l'aire cardiaque.

Les pénétrations successives des microélectrodes dans les parois des tubes cardiaques constitués de 2 à 4 couches cellulaires sont délicates et provoquent fréquemment l'apparition d'un nouveau rythme.

Malgré ces difficultés, la chambre du tube cardiaque morphologiquement semblable à l'atrium du jeune tube cardiaque de l'embryon in ovo, présente des P.A. de type triangulaire, à décours rapide. La durée varie de 220 à 260 ms et l'amplitude est comprise entre 60 et 90 mV, selon la qualité de la pénétration (Fig. 27). Il n'existe pas de phase lente initiale de repolarisation. Par contre, entre les P.A., on observe une phase de dépolarisation lente diastolique caractéristique du centre d'automatisme. L'amplitude de cette pente de dépolarisation diastolique, comprise entre 5 et 10 mV, varie selon la position de l'électrode dans le tissu myocardique mais existe toujours et est seulement observée dans cette région du tube cardiaque (Fig. 27 A, B, C et D).

Les potentiels d'action enregistrés dans cette chambre cardiaque, comparés aux résultats obtenus sur le coeur embryonnaire in situ, les apparentent aux tracés atriaux. La morphologie de cette région du tube cardiaque et les caractéristiques électriques de ses P.A. nous amènent à conclure à la différenciation du tissu myocardique atrial dans les tubes cardiaques formés in vitro.

L'exploration de la chambre moyenne du tube cardiaque nous a permis d'obtenir des potentiels d'action de type rectangulaire, présentant une phase de repolarisation lente durable (pente de 0,14 à 0,16 V/s). L'amplitude de ces P.A. varie de 70 à 100 mV et leur durée est en moyenne de 270 ms. La vitesse de la phase ascendante du P.A. est lente, d'une valeur de 11,3 V/s environ (Fig. 25 C). Dans cette région du tube cardiaque, la diastole est isopotentielle (Fig. 27 E).

Les potentiels enregistrés présentent donc toutes les caractéristiques de l'activité électrique transmembranaire des cellules ventriculaires. L'absence

de pente de dépolarisation lente diastolique montre que le myocarde ventriculaire est entraîné par le tissu atrial.

Les enregistrements obtenus dans la région antérieure du tube cardiaque assimilée morphologiquement au bulbe artériel du tube cardiaque normal ne nous ont pas permis d'observer des P.A. de type bulbaire typique. Les P.A. sont de type rectangulaire et présentent des pentes de repolarisation lente comparables à celles des cellules ventriculaires.

IV. - Conclusions.

L'activité électrique intracellulaire au cours du développement embryonnaire subit des modifications ainsi que le montrent les enregistrements effectués sur le coeur d'embryons aux 2ème, 3ème, 4ème et 19ème jours d'incubation.

La vitesse de la phase ascendante du P.A. augmente au cours du développement. A partir d'une vitesse lente dans le cas du coeur de l'embryon de 2 jours (5,8 V/s) on atteint la vitesse de 37 V/s chez des lambeaux ventriculaires de coeurs embryonnaires de 19 jours. Parallèlement, la durée du P.A. diminue, passant de 240 ms à 2 jours à 200 ms au 19ème jour d'incubation. De telles modifications suggèrent des modifications de perméabilités membranaires au cours de l'ontogenèse. BERNARD, RAYMOND, GROS et GARGOUÏL (1968 c et 1969) ont mentionné des modifications de l'activité électrique intracellulaire au cours du développement embryonnaire du coeur de rat. Au niveau de l'activité électrique ventriculaire, la diminution en durée du P.A. observée au cours du développement rappellent les observations de TRICOCHÉ et coll. (1961) réalisées sur le ventricule d'Amblystome. BERNARD et coll. (1968 c et 1969) sur le ventricule des fœtus de rat mentionnent également le raccourcissement de la réponse électrique au cours de l'ontogenèse. De telles remarques suggèrent une augmentation de la conductance potassique retardée qui provoquerait ainsi une repolarisation plus précoce et, en conséquence, une diminution dans la durée du P.A. .

Ces changements observés dans l'activité électrique des coeurs in situ de différents âges et sur des lambeaux ventriculaires, résultent probablement de modifications au niveau des perméabilités de la membrane myocardique. Nous

retiendrons ces conclusions comme hypothèse de travail dont l'analyse sera entreprise au cours d'un chapitre ultérieur.

Nous avons également noté l'augmentation de l'amplitude du P.A. et de la polarisation membranaire au cours de l'ontogenèse. En ce qui concerne l'amplitude du P.A., l'augmentation est difficilement chiffrable. En effet, il est difficile d'affirmer que les amplitudes enregistrées correspondent rigoureusement à l'amplitude réelle des phénomènes cellulaires du fait de la faible épaisseur de l'épimyocarde aux jeunes stades du développement (2 et 3 jours) et de la petitesse des cellules myocardiques (6 à 8 μ), facteurs qui rendent difficile l'empalement des cellules par les microélectrodes. YEH et HOFFMAN (1968) ont déjà souligné cette difficulté. Toutefois, on peut conclure avec certitude à une augmentation de l'amplitude des P.A. au cours de l'ontogenèse ainsi que de la valeur du potentiel membranaire de repos. Récemment, SPERELAKIS et SHIGENOBU (1972) ont montré que le potentiel membranaire de repos et l'amplitude du P.A. des cellules ventriculaires du coeur embryonnaire de poulet augmentaient au cours du développement. Le potentiel membranaire de repos des cellules myocardiques ventriculaires de - 35 mV à 2 jours d'incubation atteint - 63 mV à 7 jours. A partir de ce stade, l'augmentation est faible puisque à 18 jours d'incubation et 4 jours après l'éclosion, la valeur moyenne du potentiel membranaire de repos est de - 70 mV (Fig. 28). De la même façon, l'inversion de potentiel augmente, passant d'une valeur de + 13 mV à 2 et 3 jours d'incubation à + 28 mV à 9 jours d'incubation, cette dernière valeur restant stable par la suite (Fig. 28). Si l'on se réfère aux concentrations extracellulaires en ions K^+ indiquées par KLEIN (1963) et THURESON-KLEIN et KLEIN (1971), la forte concentration en K^+ externe aux jeunes stades du développement peut expliquer, compte tenu de l'action des milieux hyperpotassiques sur la polarisation membranaire, la faible valeur du potentiel membranaire de repos aux stades correspondants.

Nous avons vu, au chapitre précédent, que l'évolution en culture in vitro du mésoderme précardiaque de l'embryon de poulet dépend de l'environnement tissulaire qui lui est fourni. Cultivé isolément il donne naissance à un amas compact de tissu myocardique. Par contre, au contact d'un feuillet épithélial, le mésoderme

forme une structure tubulaire comparable au tube cardiaque des jeunes stades du développement. Dans ces conditions, la prolifération cellulaire est freinée au profit de la morphogenèse et de l'histogenèse.

A cette différence d'évolution sur le plan morphologique, s'ajoute une différence sur le plan de la différenciation des catégories cellulaires qui a pu être mise en évidence par la méthode électrophysiologique. Lorsque la formation d'une structure tubulaire est rendue possible par les conditions expérimentales réalisées, les catégories cellulaires du myocarde qui sont déjà déterminées à des niveaux différents de l'aire cardiaque, ainsi que l'ont démontré G. LE DOUARIN, OBRECHT et CORABOEUF (1966) se différencient. Ainsi, des P.A. atriaux et ventriculaires sont enregistrés et montrent par ailleurs que le foyer d'automatisme reste localisé à la chambre sino-atriale. La faible vitesse de dépolarisation d'une part, la durée du P.A. d'autre part confèrent à ce tube des caractères de coeur d'embryon de 2 jours d'incubation. Toutefois nous n'avons pas pu, dans nos conditions expérimentales, obtenir la preuve électrophysiologique de l'existence de cellules myocardiques bulbaires.

Par contre, le mésoderme précardiaque, lorsqu'il se différencie isolément, ne donne naissance qu'à une seule catégorie cellulaire qui, d'après ses caractéristiques électrophysiologiques, est ventriculaire.

Il semble donc que, dans les conditions de la culture in vitro en milieu liquide, le mésoderme précardiaque isolé de tout feuillet épithélial n'atteint que le stade de développement correspondant à l'automatisme initial du coeur. Contrairement aux résultats de Van MIEROP (1967) partisan d'un automatisme initial sino-atrial, OBRECHT-COUTRIS, G. LE DOUARIN et CORABOEUF (1968) ont montré en se basant d'une part sur la morphologie du P.A. et d'autre part sur la durée de celui-ci que dans la phase initiale du fonctionnement du coeur, ce sont les cellules ventriculaires qui présentent les caractéristiques de l'automatisme. Les résultats de ces auteurs sont d'ailleurs en parfait accord avec les observations morphologiques montrant qu'au début de son activité l'ébauche cardiaque est composée seulement de tissu ventriculaire. Depuis les travaux de FÂNGE, PERSSON et THESLEFF (1957), puis ceux de G. LE DOUARIN, OBRECHT et

CORABOEUF (1966), on sait que l'automatisme n'est pas dû à des cellules particulières aux jeunes stades du développement du coeur, mais est une propriété commune à tous les myoblastes. Ainsi, les cellules mésodermiques placées en culture in vitro en milieu liquide exprimeraient leurs potentialités originelles et conserveraient, tout au long de la culture, leurs caractéristiques automatiques de type ventriculaire. On peut penser que les futures cellules atriales étant au moment de l'explantation moins différenciées que ne le sont les cellules ventriculaires présomptives, ne parviennent pas à un stade de différenciation fonctionnel prenant normalement le relais de l'automatisme ventriculaire initial.

Lorsqu'on favorise la morphogenèse du tube cardiaque, au moins deux catégories cellulaires du myocarde se différencient (cellules sino-atriales et cellules ventriculaires) et, dans ces conditions, le foyer d'automatisme de la préparation est du type sino-atrial et les cellules ventriculaires sont entraînées.

La possibilité d'obtenir in vitro soit un tissu myocardique pulsatile présentant les caractéristiques de l'automatisme initial de type ventriculaire ou un tube cardiaque nous a paru intéressante car susceptible d'apporter des précisions sur le fonctionnement cardiaque aux stades précoces de l'ontogenèse.

Deuxième partie :

=====

A. - Action des catécholamines.

I - Les effets chronotropes des catécholamines sur le coeur de l'embryon de poulet à différents stades du développement.

1. action de l'adrénaline.
2. action de la noradrénaline.

II - Action de l'adrénaline sur le tissu myocardique différencié en culture in vitro.

1. action de l'adrénaline sur le rythme des contractions des explants.
2. action de l'adrénaline sur l'activité électrique.

III - Conclusions.

1. Les effets des catécholamines sur le rythme cardiaque
2. Les effets des catécholamines sur l'activité électrique.

B. - Mise en évidence d'une substance cholinergique dans le tissu myocardique aneural différencié in vitro.

I - Effets de l'entraînement électrique des préparations myocardiques différenciées en culture in vitro.

1. Les modifications de l'activité électrique.
2. Facteurs influant sur la durée de l'I. P. S.

II - Activité cholinestérasique du tissu myocardique aneural.

1. Activité cholinestérasique des tubes cardiaques d'embryons de 2 jours d'incubation.
2. Activité cholinestérasique des tubes cardiaques différenciés en culture in vitro.
3. Activité cholinestérasique du tissu myocardique différencié en culture in vitro à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque.

III - Conclusions.

L'historique de ce travail a rappelé que les nombreux auteurs qui ont étudié l'action des catécholamines sur le coeur embryonnaire parviennent à des conclusions divergentes. Ainsi, HALL (1957) rapporte que l'adrénaline administrée au coeur embryonnaire de rat de 11 jours produit des effets chronotropes positifs. Par contre BERNARD et GARGOUÏL (1967 a) montrent que cette amine n'augmente le rythme cardiaque de l'embryon de rat qu'à partir du 16ème jour du développement, c'est-à-dire au moment de l'achèvement de l'innervation cardiaque. Des résultats contradictoires concernant la sensibilité aux catécholamines ont également été obtenus dans le cas du coeur embryonnaire de poulet. Cependant OBRECHT-COUTRIS et CORABOEUF (1967) ont montré l'existence d'une sensibilité précoce à la noradrénaline du coeur embryonnaire de poulet au 3ème jour de l'incubation. Ce résultat implique l'existence dans le myocarde embryonnaire jeune de récepteurs β . Les modifications de l'activité électrique intracellulaire dues à l'administration d'adrénaline sont très controversées. Selon FINGL, WOODBURY et HECHT (1952) l'adrénaline augmenterait la vitesse de repolarisation et diminuerait la durée du plateau du potentiel d'action du coeur embryonnaire de poulet. Cependant, on admet en général (CORABOEUF, DISTEL et BOISTEL, 1955; GARGOUÏL, TRICOCHÉ, FROMENTY et CORABOEUF, 1958) que l'adrénaline entraîne un retard de la repolarisation, ainsi qu'un rebondissement marqué de la phase lente de repolarisation et une accélération de la phase rapide de la repolarisation.

Nous avons pensé qu'il était intéressant d'étudier l'action des catécholamines sur une préparation automatique aneurale de tissu myocardique différencié en culture in vitro dans le but de savoir si les récepteurs sensibles à l'action de ces substances se différenciaient dans ces conditions expérimentales.

Les expériences de BERNARD, GARGOUÏL et PAGER (1967) effectuées sur le coeur de rat pendant la vie foetale, montrent qu'avant l'innervation seule la noradrénaline produit des effets chronotropes positifs alors qu'après l'innervation (16 jours post-coïtum) les effets chronotropes positifs ne sont obtenus qu'après administration d'adrénaline. Ces modifications de sensibilité aux amines biogènes se manifestant lors de l'établissement de l'innervation, ces auteurs suggèrent que cette

innervation entraîne des remaniements membranaires produisant des modifications dans les sites récepteurs adrénergiques.

Ces observations nous ont amené à entreprendre l'étude de l'action de l'adrénaline et de la noradrénaline sur des coeurs d'embryons de poulet aux jeunes stades du développement. D'autre part, CREPIN et G. LE DOUARIN (1966) ont montré l'apparition d'une activité acétylcholinestérasique dans le tissu myocardique différencié en culture in vitro à partir du mésoderme précardiaque isolé de l'embryon de poulet. OBRECHT-COUTRIS, CORABOEUF et G. LE DOUARIN (1966, 1968) et OBRECHT-COUTRIS et CORABOEUF (1967) ont mis en évidence l'existence d'une acétylcholine endogène. L'automatisme cardiaque embryonnaire semble lié d'une part à la présence de sites cholinestérasiques et d'autre part à l'acétylcholine endogène. Dans le cas du tissu myocardique différencié en culture in vitro à partir du mésoderme précardiaque, nous avons utilisé des techniques microélectrophysiologiques et histochimiques pour tenter de mettre en évidence dans ce tissu automatique aneural l'existence d'une substance cholinergique responsable de l'autorythmicité des explants.

A. ACTION DES CATECHOLAMINES.

=====

La technique d'administration de ces substances aux coeurs embryonnaires de poulet a été précédemment décrite et nous avons insisté tout particulièrement sur les précautions que nous avons prises afin d'éviter toute fluctuation du rythme des contractions résultant de variations thermiques.

I. - Les effets chronotropes des catécholamines sur le coeur de l'embryon de poulet à différents stades du développement.

L'expérience a été conduite selon le même protocole pour l'administration de noradrénaline et pour celle d'adrénaline. Le rythme initial des contractions est compté (temps nécessaire au déroulement de 25 pulsations) dans le milieu liquide de RINALDINI. Dans un deuxième temps, les effets chronotropes éventuels de l'amine sont évalués 30 secondes et 10 minutes après son administration dans le milieu liquide de culture. Pour chaque coeur traité, plusieurs comptages (2 à 4) sont effectués aux temps indiqués; la valeur moyenne du rythme est comparée au rythme des contractions avant l'application de la substance.

Nous avons étudié l'action des catécholamines sur des coeurs d'embryons de poulet depuis le stade de 14 somites (45 heures d'incubation environ) jusqu'à 5 jours d'incubation.

1 - Action de l'adrénaline.

Nous avons utilisé de la L-Adrénaline (Merck) à la concentration finale de 10^{-4} g/ml de milieu liquide. Les résultats obtenus 30 secondes et 10 minutes après l'administration d'adrénaline sont identiques: les pourcentages de variation des rythmes cardiaques en fonction du rythme initial sont les mêmes. Le tableau I rend compte des effets de l'adrénaline sur le rythme des battements à divers stades de l'ontogenèse cardiaque.

Stade	N ^{bre} de cas	% de varia- tion du rythme	Stade	N ^{bre} de cas	% de varia- tion du rythme	Stade	N ^{bre} de cas	% de varia- tion du rythme
14 s	7	+11,1 ⁺ _{-0,3}	21 s	12	+10,1 ⁺ _{-0,5}	32 s	14	+10,8 ⁺ _{-0,2}
15 s	4	+12,8 ⁺ _{-0,2}	23 s	12	+9,0 ⁺ _{-0,4}	33 s	13	+5,9 ⁺ _{-0,4}
16 s	11	+14,5 ⁺ _{-0,4}	24 s	11	+12,3 ⁺ _{-0,4}	35 s	11	+6,6 ⁺ _{-0,4}
17 s	11	+15,6 ⁺ _{-0,4}	27 s	8	+10,1 ⁺ _{-0,8}	40 s	8	+9,0 ⁺ _{-0,3}
18 s	10	+18,0 ⁺ _{-0,1}	28 s	10	+7,8 ⁺ _{-0,2}	3,5 j.	15	+7,0 ⁺ _{-0,3}
19 s	9	+21,0 ⁺ _{-0,6}	29 s	11	+7,6 ⁺ _{-0,3}	4 j.	18	+4,9 ⁺ _{-0,3}
20 s	12	+8,4 ⁺ _{-0,3}	30 s	17	+11,0 ⁺ _{-0,5}	5 j.	15	+7,8 ⁺ _{-0,6}

Tableau I

Pourcentage de variation du rythme cardiaque en fonction du rythme initial après administration d'adrénaline à la concentration de 10^{-4} g/ml (valeur moyenne et écart type)

Ces résultats font apparaître une sensibilité à l'adrénaline du coeur embryonnaire de poulet qui évolue avec le stade de développement (Fig. 29). Pour les stades étudiés, les effets chronotropes positifs observés permettent de distinguer 3 périodes de sensibilités différentes.

- Pour les stades de 14 à 19 somites le pourcentage de variation est nettement supérieur à 10 % (15,5 % en moyenne).

- Du stade de 20 somites à celui de 32 somites, le pourcentage de variation du rythme est d'environ 10 % (9,7 % en moyenne).

- Au-delà du stade de 32 somites, le pourcentage de variation est nettement inférieur à 10 % (7 % en moyenne).

On assiste, au cours du développement embryonnaire, à une diminution des effets chronotropes positifs jusqu'au 5ème jour de l'incubation.

2 - Action de la noradrénaline.

La noradrénaline, L. Noradrénaline (Fluka), a été administrée à la concentration finale de 10^{-4} g/ml. Les résultats obtenus diffèrent après les deux temps d'action choisis, 30 secondes et 10 minutes.

Dès l'administration de L-noradrénaline, le rythme cardiaque est augmenté dans tous les cas, alors que 10 minutes après l'administration le rythme cardiaque par rapport au rythme initial est toujours diminué pour des coeurs provenant d'embryons jeunes, jusqu'au 3ème jour de l'incubation. Au contraire, sur les coeurs d'embryons de 4 et 5 jours d'incubation, les effets chronotropes positifs sont nettement marqués après 10 minutes, tout en étant inférieurs à ceux qui sont observés immédiatement après l'administration de l'amine (Fig. 29).

L'ensemble de ces résultats est consigné dans le tableau II.

Comme pour l'action de l'adrénaline, l'action immédiate de la noradrénaline sur le rythme cardiaque montre trois séquences en rapport avec le stade de développement de l'embryon:

- Aux stades jeunes (de 11 à 19 somites) l'accélération du rythme cardiaque sous l'effet de la noradrénaline est très important (en moyenne 26 %).

- Pour des stades compris entre 20 et 32 somites, l'augmentation du rythme est nette (16 % en moyenne) mais toujours inférieure à celle qui est notée pour les stades antérieurs du développement.

- Au-delà du stade de 32 somites, le rythme cardiaque est augmenté sous l'effet de l'amine et la moyenne est de 25 %, donc très proche de l'augmentation moyenne du rythme mentionné pour les coeurs des jeunes embryons (de 11 à 19 somites). De plus, durant cette période du développement, les effets chronotropes positifs sont d'autant plus marqués que les coeurs proviennent d'embryons plus âgés.

Dix minutes après l'administration de la noradrénaline, les effets obtenus diffèrent grandement de ceux observés initialement. Le rythme cardiaque est ralenti

% de variations du rythme cardiaque 30 secondes après l'administration de Noradrénaline				
Stade	bre N - de cas	% de varia- tion du rythme	Stade	bre N - de cas
11 s	9	+24, 0-0, 3 ⁺	29 s	11
17 s	7	+30, 0-0, 4 ⁺	30 s	8
18 s	13	+29, 0-0, 4 ⁺	31 s	14
19 s	9	+21, 0-0, 2 ⁺	36 s	12
21 s	13	+19, 3-0, 3 ⁺	37 s	11
24 s	14	+17, 5-0, 4 ⁺	4 j.	15
25 s	10	+17 ⁺ -0, 3	5 j.	15

% de variations du rythme cardiaque 10 minutes après l'administration de Noradrénaline				
Stade	bre N - de cas	% de varia- tion du rythme	Stade	bre N - de cas
11 s	11	-1, 0-0, 1 ⁺	28 s	13
16 s	13	-2, 1-0, 1 ⁺	31 s	12
18 s	14	-2, 0-0, 3 ⁺	35 s	14
20 s	9	-6, 0-0, 3 ⁺	38 s	10
22 s	12	-9, 6-0, 3 ⁺	4 j.	15
24 s	7	-10, 3-0, 3 ⁺	5 j.	14
25 s	11	-11, 0-0, 2 ⁺	5, 5 j.	15

Tableau II

Effets de la L. Noradrénaline sur le rythme cardiaque embryonnaire.

à gauche : effets immédiats de la noradrénaline
à droite : variations du rythme cardiaque embryonnaire 10 minutes après l'administration de noradrénaline
(valeurs moyennes et écart-type)

pour les coeursjeunes et jusqu'au stade de 40 somites. Ce ralentissement du rythme des contractions cardiaques est net pour les coeurs provenant d'embryons de stades compris entre celui de 20 somites et celui de 40 somites (diminution du rythme de 11,5 % en moyenne). Par contre le rythme cardiaque des embryons de 4 jours d'incubation est revenu à sa valeur initiale dix minutes après l'administration de la noradrénaline. Les coeurs embryonnaires de 5 jours et 5 jours et demi de développement présentent un rythme de contractions supérieur au rythme cardiaque initial (augmentation de 13 % environ).

Cette différence entre les effets immédiats et les effets "retardés" de la noradrénaline sur le rythme cardiaque nous a conduits à étudier la cinétique de l'action de la noradrénaline. Cette étude a été réalisée sur des coeurs provenant d'embryons de stades auxquels les effets immédiats et stabilisés sont nettement différents. Pour celà nous avons retenu les stades de 14 somites, 29 somites, 40 à 45 somites (4 jours d'incubation) et des coeurs d'embryons de 5 jours. La concentration finale de noradrénaline a été de 10^{-4} g/ml. Les résultats sont indiqués dans le tableau III et sur la figure 30.

Dans tous les cas, l'administration de noradrénaline produit immédiatement une accélération importante mais fugace du rythme cardiaque. Après cette augmentation transitoire du rythme cardiaque, le rythme diminue et atteint, après 10 à 15 minutes, une valeur stable. Avant de parvenir à un rythme cardiaque constant la fréquence des contractions évolue différemment selon le stade de développement de l'embryon:

- Au stade de 14 somites, le rythme diminue progressivement et se stabilise 20 mn après l'administration de la noradrénaline. La fréquence cardiaque est alors réduite de moitié par rapport à sa valeur initiale.

- Au stade de 29 somites, la diminution du rythme des contractions s'effectue par palier. Le rythme se stabilise pendant 5 mn (de la deuxième à la cinquième minute d'action) à une valeur de 23 % environ. A nouveau la fréquence des contractions diminue pour atteindre un maximum de 35 % 10 mn après l'administration de la noradrénaline. Le rythme cardiaque ne se maintient pas à cette valeur extrême; il augmente progressivement pour se fixer à une valeur de 15 % inférieure au rythme initial.

Stades de Temps dévelop. d'action	14 somites (7 cas)	29 somites (11 cas)	4 jours (14 cas)	5 jours (10 cas)
30 sec.	+27,2 ⁺ 1,1	+10,1 ⁺ 0,5	+22,3 ⁺ 0,6	+42,3 ⁺ 1,3
2 mn.	+20,0 ⁺ 0,8	-17,7 ⁺ 0,3	-10,2 ⁺ 0,2	+25,1 ⁺ 0,7
3 mn.	+14,7 ⁺ 0,6	-20,2 ⁺ 0,3	-15,4 ⁺ 0,9	+21,0 ⁺ 0,2
5 mn.	0 ⁺ 0,4	-23,2 ⁺ 0,3	-13,4 ⁺ 0,6	+21,2 ⁺ 0,3
7 mn.	-8,1 ⁺ 0,4	-23,9 ⁺ 0,6	-13,1 ⁺ 0,2	+20,8 ⁺ 0,3
10 mn.	-20,2 ⁺ 0,5	-35,1 ⁺ 0,4	-1,3 ⁺ 0,2	+21,3 ⁺ 0,2
15 mn.	-42,3 ⁺ 0,7	-30,6 ⁺ 0,6	0 ⁺ 0,4	+21,0 ⁺ 0,2
17 mn.	-47,0 ⁺ 0,8	-25,4 ⁺ 0,7	0 ⁺ 0,3	+21,0 ⁺ 0,4
20 mn.	-51,2 ⁺ 0,4	-15,0 ⁺ 0,3	0 ⁺ 0,3	+21,0 ⁺ 0,3
25 mn.	-55,0 ⁺ 0,3	-15,2 ⁺ 0,3	0 ⁺ 0,3	+21,1 ⁺ 0,6
35 mn.	-55,0 ⁺ 0,3	-15,0 ⁺ 0,3	0 ⁺ 0,3	+21,0 ⁺ 0,3
45	-55,0 ⁺ 0,3	-15,0 ⁺ 0,4	0 ⁺ 0,3	+21,0 ⁺ 0,4

Tableau III

Effets de la noradrénaline sur le rythme des contractions cardiaques en fonction du temps d'action de la substance. Les variations du rythme (valeurs moyennes et écart type) sont exprimées en pourcentage du rythme initial. Les effets chronotropes positifs sont indiqués par des chiffres positifs, les effets chronotropes négatifs par des chiffres négatifs.

- Les coeurs embryonnaires de 4 jours présentent une évolution des modifications du rythme cardiaque assez semblables à celles qui sont observées pour le stade de 29 somites. En effet, après une diminution notable du rythme des contractions (-15 % environ du rythme initial), le rythme cardiaque augmente et se stabilise à sa

valeur initiale. Cette récupération du rythme initial avait déjà été signalée au cours de l'étude des effets tardifs de la noradrénaline sur le coeur de 4 jours.

- Sur des coeurs d'embryons au cinquième jour d'incubation, après la forte accélération du rythme (42 % du rythme initial), en moins de 5 mn, le rythme cardiaque demeure accéléré de 20 % et se maintient à cette valeur.

Dès les stades précoces de la différenciation cardiaque (embryons aux stades de 11 et 19 somites), les membranes des myoblastes cardiaques possèdent des récepteurs adrénérgiques. A cet égard, tant l'adrénaline que la noradrénaline produisent à tous les stades, au moins dans leurs actions immédiates, des effets chronotropes positifs. Toutefois, l'administration de noradrénaline s'avère plus efficace, à tous les stades étudiés de l'ontogenèse cardiaque, que l'adrénaline.

Il nous a paru intéressant d'entreprendre l'étude de l'action de l'adrénaline sur le tissu myocardique différencié in vitro en milieu liquide, à partir du mésoderme précardiaque, dans le but de savoir si les récepteurs sensibles à l'action de cette substance se différenciaient dans ces conditions expérimentales.

II. - Action de l'adrénaline sur le tissu myocardique différencié en culture in vitro.

Les expériences ont porté sur 20 explants à l'issue du deuxième jour de culture. Le milieu de culture est renouvelé et une heure après environ le rythme des battements est noté. Le milieu de culture est remplacé par un nouveau milieu de même composition mais contenant de l'adrénaline (L-adrénaline Merck) à la concentration finale de 10^{-5} g/ml.

1 - Action de l'adrénaline sur le rythme des contractions des explants.

Le rythme des battements est noté quinze minutes après l'administration de l'adrénaline et les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau IV. Après trois heures d'action de l'adrénaline, le milieu est remplacé par un milieu normal dépourvu de la substance et le rythme des battements est à nouveau noté.

Le rythme des battements est nettement accéléré et la moyenne d'augmentation pour l'ensemble de l'expérience est de 22 % du rythme initial. La figure 31 A

Rythme des contractions spontanées (nombre de contractions par minute)						
I	II	III		I	II	III
133	150	136		70	92	78
100	120	100		70	80	70
92	120	94		66	80	58
85	120	86		63	73	65
80	120	82		60	77	57
80	100	83		57	75	49
80	109	80		48	52	48
80	92	84		44	52	46
75	70	72		38	42	36
75	92	76		36	42	37

Tableau IV

Action de l'adrénaline à la concentration de 10^{-5} g/ml sur le rythme des contractions spontanées du tissu myocardique différencié in vitro à partir du mésoderme précardiaque. Les valeurs sont indiquées pour les 20 cas de cette série expérimentale.

- I. - Rythme des contractions avant l'administration d'adrénaline (valeur moyenne: $71^{+1,1}$).
- II. - Rythme des contractions après 15 minutes de séjour dans l'adrénaline (valeur moyenne: $88^{+0,9}$).
- III. - Rythme des contractions après retour dans un milieu sans adrénaline (valeur moyenne: $73^{+1,2}$).

Rythme des contractions spontanées (nombre de contractions par minute)						
I	II	III		I	II	III
120	133	122		75	92	76
100	100	100		70	92	70
100	120	108		69	80	72
92	109	94		63	75	64
80	120	77		60	52	58
80	109	83		56	50	58
80	92	82		39	50	41
80	92	80		37	50	36
75	115	72		36	44	35

Tableau V

Action d'une seconde administration d'adrénaline sur le rythme des contractions du tissu myocardique.

I. - Rythme des contractions avant l'administration d'adrénaline
(valeur moyenne: $73^{+0,8}$).

II. - Rythme des contractions 15 minutes après l'administration
d'adrénaline (valeur moyenne: $87^{+0,9}$).

III. - Rythme des contractions après retour au milieu de culture
sans adrénaline (valeur moyenne: $74^{+1,1}$).

indique la répartition des rythmes observés pendant l'action de l'adrénaline. Les effets de l'adrénaline sont parfaitement réversibles; lorsque les explants sont transférés dans un milieu de culture de composition normale, le rythme initial des battements est retrouvé.

Si quatre heures après la première administration d'adrénaline les explants sont soumis dans les mêmes conditions à une seconde dose d'adrénaline à la même concentration, les résultats sont proches de ceux obtenus lors de la première administration comme en témoignent les valeurs indiquées dans le tableau V et la figure 31 B.

L'augmentation moyenne est de 20,2 % du rythme initial, contre 22 % au cours de la première action.

Le tissu myocardique différencié en culture in vitro est sensible à l'action de l'adrénaline. La sensibilité à cette substance apparaît donc indépendamment de l'innervation puisque dans les conditions de la culture in vitro le tissu myocardique est totalement aneural.

2 - Action de l'adrénaline sur l'activité électrique.

Les expériences ont été effectuées sur le tissu myocardique de poulet différencié en culture in vitro en milieu liquide.

Les effets chronotropes positifs observés précédemment se traduisent sur le plan électrophysiologique par une augmentation de la fréquence d'apparition des potentiels d'action (Fig. 32 A). Avant l'administration de l'adrénaline, la pente de dépolarisation diastolique est de 0,012 V/s. Une seconde environ après l'administration d'adrénaline, la pente de dépolarisation diastolique est augmentée et atteint 0,022 V/s, soit une augmentation de 90 % de sa valeur initiale. Dans la plupart des cas, l'amplitude des P.A. est augmentée sous l'action de l'adrénaline.

Il est fréquent d'observer après quelques secondes d'action de l'adrénaline l'apparition d'un ressaut de potentiel qui modifie le décours du plateau de repolarisation (Fig. 32 B et C). Cette observation rejoint celle de CORABOEUF, DISTEL et BOISTEL (1955) sur le tissu auriculaire de chien préalablement déprimé et celle de GARGOUIL, TRICOCHÉ, FROMENTY et CORABOEUF (1958) sur le cœur de rat en hypothermie.

Sur certaines préparations déprimées, présentant des contractions à un rythme très lent, l'activité électrique révèle l'existence d'ondulation du potentiel de membrane (Fig. 33). Lorsque ces ondes de dépolarisation du potentiel membranaire atteignent un certain seuil, un potentiel d'action se déclenche. L'adrénaline administrée à de telles préparations entraîne une accélération du rythme d'apparition des potentiels d'action. Chaque onde de dépolarisation membranaire atteint un seuil de dépolarisation suffisant pour produire un P.A. (Fig. 33). Cette observation rejoint celle de OTSUKA (1958) sur le tissu conducteur de mouton. Cet auteur a montré que l'adrénaline administrée à cette préparation initialement silencieuse provoque une dépolarisation et des ondes du potentiel de membrane qui sont capables de déclencher des réponses propagées. Les P.A. présentent également, au début du plateau de repolarisation, le ressaut de potentiel déjà signalé.

Les effets chronotropes positifs de l'adrénaline sur l'activité du tissu myocardique aneural se traduisent par des modifications du décours de l'activité électrique cellulaire. La pente de dépolarisation diastolique est augmentée et la phase initiale de la repolarisation présente un rebond. D'autre part, l'adrénaline est capable d'initier une activité propagée au niveau d'une préparation déprimée. Ces modifications de l'activité électrique sous l'influence de l'adrénaline suggèrent que cette substance doit intervenir sur les perméabilités membranaires au cours du cycle cardiaque sur ce matériel aneural.

III. - Conclusions.

1 - Les effets des catécholamines sur le rythme cardiaque.

Le coeur embryonnaire de poulet, dès les stades précoces du développement, est sensible aux catécholamines (adrénaline et noradrénaline). Ce résultat est en accord avec celui qui a été obtenu par OBRECHT-COUTRIS et CORABOEUF (1967) sur le myocarde embryonnaire de poulet de deux et trois jours d'incubation, donc non encore innervé. Toutefois, les effets chronotropes positifs sont plus marqués après l'administration de la noradrénaline qu'après l'application de l'adrénaline. L'adrénaline dont les effets "immédiats" et "retardés" sont identiques, se montre plus active tout au

début de la différenciation cardiaque (jusqu'au stade de 20 somites) qu'au cours du développement ultérieur jusqu'à 5 jours. L'accélération du rythme des contractions cardiaques sous l'influence de l'adrénaline dès les stades précoces de l'ontogenèse cardiaque implique la présence de récepteurs β adrénergiques au niveau de la membrane des myoblastes.

Si l'on se réfère aux résultats obtenus après l'administration de noradrénaline, il faut distinguer les effets immédiats dus à l'administration de cette substance, des effets "retardés". L'existence de ces deux effets peut être une des causes des résultats hétérogènes obtenus par les auteurs et signalés dans l'historique de ce travail. Quel que soit le stade du développement cardiaque, l'administration de noradrénaline produit une accélération transitoire et fugace du rythme cardiaque. Cette augmentation du rythme des contractions est toujours plus importante que celle qui est obtenue après l'administration d'adrénaline.

Les modifications de la fréquence des contractions quelques minutes après l'application de noradrénaline (effets "retardés") dépendent de l'état de la différenciation cardiaque. Jusqu'au stade de développement de 40 somites (3 jours et demi d'incubation), le rythme des contractions est diminué; le coeur embryonnaire de 4 jours d'incubation revient à son rythme initial 10 minutes après l'administration de noradrénaline. Par contre, au-delà de ce temps d'incubation, le rythme cardiaque demeure accéléré (+21 %).

Ces résultats diffèrent de ceux obtenus sur le coeur de rat par BERNARD et GARGOUÏL (1967a) et BERNARD, PAGER et GARGOUÏL (1967b). Ces auteurs ont montré qu'au cours de l'établissement de l'innervation la sensibilité aux catécholamines du myocarde embryonnaire s'inversait chez cette espèce. Alors que la noradrénaline est active aux stades précoces du développement cardiaque et jusqu'au 16ème jour post-coïtum, l'administration d'adrénaline est sans effet. A partir du 16ème jour de la gestation, l'adrénaline a des effets chronotropes positifs sur le coeur, alors que la noradrénaline est inefficace.

Une différence du même ordre ne se retrouve pas dans le cas du coeur de l'embryon de poulet. Les effets biphasiques de la noradrénaline sur le coeur embryon-

naire de poulet, nous amènent à penser que le concept général d'un seul type de récepteur β est insuffisant pour expliquer les phénomènes observés. Pour interpréter les effets immédiats et retardés causés par l'administration de cette amine, il est tentant d'adapter le concept établi dans le cas de l'action de l'acétylcholine par ROBERTS, GIEMENO et WEBB (1965a et b). On peut envisager qu'il existerait deux sites d'action pour la noradrénaline au niveau de la membrane des cellules myocardiques, un site stimulateur (Ss) et un site inhibiteur (Si). Les effets chronotropes immédiats et "retardés" de la noradrénaline sur le rythme cardiaque pourraient s'interpréter en admettant que les sites Ss et les sites Si diffèrent entre eux essentiellement par leur aptitude à fixer plus ou moins rapidement l'amine. Dès l'administration de noradrénaline, les Ss fixent la substance très rapidement, alors que les sites Si auraient une cinétique lente de fixation de l'amine. Dans ce cas, la noradrénaline exerce des effets chronotropes positifs. Puis, la noradrénaline fixée sur les sites Ss serait catabolisée selon une cinétique rapide propre à ces sites, alors que les sites Si dans le même temps fixeraient progressivement l'amine. L'effet chronotrope négatif se manifesterait alors.

Les différences de sensibilité à la noradrénaline au cours des effets "retardés" que nous avons signalées à divers stades de la différenciation cardiaque (Fig. 30), peuvent s'interpréter sur la base de la dualité des sites récepteurs à cette amine. On peut admettre que l'aptitude à la fixation de la noradrénaline des sites Ss et des sites Si varie au cours du développement. Ainsi, aux stades précoces de l'ontogenèse cardiaque, les sites Si seraient plus efficaces que les sites Ss et les effets chronotropes négatifs qui apparaissent sont importants (-50 % environ au stade de 14 somites). Au stade de 29 à 30 somites, l'effet "retardé" se traduisant par une faible diminution du rythme des contractions (-15 % environ), permet de penser à une atténuation de l'efficacité des sites Si ou à une augmentation de celle des sites Ss. A 4 jours d'incubation, la récupération du rythme initial des contractions 10 minutes après l'administration de noradrénaline pourrait traduire une compensation de l'efficacité entre les sites Ss et Si. Au 5ème jour de l'incubation, l'efficacité des sites Ss serait supérieure à celle des sites Si d'où il en résulte un maintien accéléré du rythme cardiaque (+21 % environ à une valeur moindre toutefois que celle observée dès l'administration de la noradrénaline (+41 % environ).

Ce maintien de l'accélération du rythme cardiaque à une valeur inférieure à celle qui est obtenue immédiatement après l'administration de la noradrénaline nous amène à envisager une deuxième hypothèse d'interprétation des phénomènes "retardés". On sait que les sites enzymatiques ont des propriétés qui peuvent être influencées par les macromolécules qui les entourent (FURCHGOTT, 1967), comme celles de la membrane cellulaire où ils sont situés. On peut penser que les sites Si différenciés tout au début de l'ontogenèse sont progressivement modifiés au cours du développement par des remaniements structuraux de la membrane cellulaire. Ces sites à cinétique lente tant pour la fixation de l'amine que pour sa destruction, verraient leurs propriétés se modifier au cours de la différenciation cardiaque. Ainsi à 4 jours d'incubation les sites Si auraient perdu leur efficacité, alors qu'au 5ème jour du développement embryonnaire ils seraient transférés en sites Ss tout en conservant leur cinétique lente. Ainsi, le maintien du rythme accéléré (+21 %) des contractions du cœur de 5 jours à une valeur inférieure à l'accélération initiale (+41 %) serait dû à la transformation progressive des sites Si en sites Ss au cours de la différenciation cardiaque.

Cette hypothèse de FURCHGOTT (1967) attribuant aux macromolécules situées au voisinage des sites enzymatiques un rôle dans leurs propriétés spécifiques peut être envisagée ici dans le cas des sites récepteurs; en effet, les résultats qui seront exposés par la suite montrent qu'au cours de la différenciation cardiaque il se produit des changements dans les perméabilités ioniques membranaires qui suggèrent des modifications structurales des membranes des myoblastes cardiaques.

Le cœur embryonnaire de poulet, dès les stades précoces de sa différenciation est donc sensible aux catécholamines. La différenciation des β récepteurs adrénergiques est donc un phénomène précoce dans le cas de ce matériel. La réponse à l'administration d'adrénaline du tissu myocardique aneural, différencié en culture in vitro en milieu liquide, en apporte la preuve. L'administration d'une seconde dose d'adrénaline produit des effets chronotropes positifs semblables à ceux qui sont obtenus lors de la première administration. Ce résultat diffère de celui qui a été obtenu par G. LE DOUARIN et RENAUD (1969) sur le tissu myocardique de caille différencié in vitro. Sur cette autre préparation aneurale, l'administration d'une seconde dose d'adrénaline

ne produit pas les effets chronotropes observés lors de la première action. Il se manifeste donc entre ces tissus une différenciation fonctionnelle entre les récepteurs sensibles à l'adrénaline. On peut penser, dans le cas des myoblastes cardiaques de poulet, que l'adrénaline est rapidement métabolisée; de ce fait, les sites récepteurs à l'adrénaline sont libérés et aptes à répondre à une seconde administration de cette substance, alors qu'au contraire dans les myoblastes cardiaques de caille, l'adrénaline ne serait métabolisée que très lentement.

2 - Les effets des catécholamines sur l'activité électrique.

Jusqu'à ces dernières années, l'interprétation des effets chronotropes et inotropes positifs de l'adrénaline au niveau des perméabilités membranaires était très discutée.

L'administration de catécholamines produit une augmentation de la fréquence d'apparition des potentiels d'action. La pente de dépolarisation diastolique augmente sous l'influence de l'adrénaline. Ce résultat suggère que l'effet exercé par l'adrénaline se traduit par une diminution de la conductance potassique au cours de la diastole. Dans le cas des fibres de Purkinje, HAUSWIRTH, NOBLE et TSIEN (1958) ont montré que l'administration d'adrénaline produit une accélération de la baisse de gK_2 , donc une dépolarisation diastolique plus rapide. En présence d'adrénaline, iK_2 chute au cours de la diastole à une valeur inférieure à sa valeur normale. La diminution de iK_2 et par conséquent la dépolarisation diastolique sont donc accélérées.

Selon HUTTER (1957) l'adrénaline diminuerait la perméabilité membranaire au potassium et augmenterait la perméabilité au sodium, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'amplitude des P.A.

Les modifications du décours de la repolarisation et notamment l'apparition d'un rebond au niveau de plateau du P.A. ont été observées sur d'autres préparations. L'élévation du plateau du P.A. sous l'effet de l'adrénaline a été rapportée dès 1955 par CORABOEUF, DISTEL et BOISTEL sur les fibres auriculaires de chien. Cet effet fut retrouvé ensuite sur le myocarde ventriculaire refroidi de rat (GARGOUIL, TRICOCHÉ, FROMENTY et CORABOEUF, 1958) et sur le tissu conducteur de cœur de chien (OTSUKA, 1958). Des résultats analogues ont été obtenus par TRAUTWEIN et

SCHMIDT (1960), par ENGSTFELD, ANTONI et FLECKENSTEIN (1961) et plus récemment par REUTER (1967). La modification du décours des P.A. en présence d'adrénaline est comparable à celle obtenue par GARNIER et CORABOEUF (1964) sur le coeur de cobaye placé dans un milieu sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} soumis à l'action de l'adrénaline depuis 1 minute.

REUTER (1967) démontre par des expériences sur le tissu conducteur effectuées en potentiel imposé que l'accroissement de l'amplitude du plateau du P.A. produit par l'adrénaline est associé à l'augmentation d'un courant lent qu'il suppose transporté par des ions calcium. VASSORT, CORABOEUF et GARGOUIL (1968) par la même technique ont montré, sur des cellules atriales de grenouille, que l'adrénaline augmente fortement le courant sodique lent entrant. On sait, par ailleurs, que dans des milieux sans sodium, le courant entrant peut être purement calcique; l'adrénaline en augmentant la perméabilité du canal lent pourrait augmenter le courant entrant calcique. VASSORT, ROUGIER, GARNIER, SAUVIAT, CORABOEUF et GARGOUIL (1968 et 1969), par l'utilisation de cette même technique et sur le même matériel, ont montré que lorsque le canal sodique rapide est inhibé par la tétrodotoxine et que le liquide de perfusion est privé de calcium, l'adrénaline accroît l'amplitude du courant sodique lent entrant. De plus, l'adrénaline est capable d'induire le développement de ce courant sodique lent sur des préparations qui en sont normalement dépourvues en abaissant le seuil d'activation du canal lent (Fig. 34).

MIRONNEAU, LENFANT et GARGOUIL (1969a et b) ont étudié, à l'aide du chlorure de manganèse, l'action de l'adrénaline sur l'activité électrique spontanée du noeud sino-auriculaire de lapin. Ces auteurs ont établi que l'adrénaline intervenait au niveau du canal lent calcico-sodique responsable du développement des réponses propagées. L'augmentation de cette perméabilité conduit à une accélération du rythme des contractions. Récemment, SHIGENOBU et SPERELAKIS (1972) ont montré dans le cas des myoblastes ventriculaires de poulet de 9 à 12 jours d'incubation soumis à l'action de la tétrodotoxine, que les catécholamines induisent précocement des réponses électriques lentes. Ces réponses, supprimées par l'administration d'ions Mn^{2+} ou de lanthane sont dues à un courant entrant d'ions Ca^{2+} . D'autre part, l'initiation de ces réponses est inhibée dans les solutions de perfusion dépourvues d'ions Ca^{2+} .

Ces résultats concordants montrent que l'adrénaline augmente la perméabilité calcico-sodique lente. La pénétration d'ions calcium dans les myoblastes cardiaques pouvant déclencher des contractions (LUTTGAU et NIEDERGERKE, 1958; WEIDMANN, 1959), l'augmentation de la perméabilité aux ions Ca^{2+} sous l'action de l'adrénaline permet d'interpréter les effets inotrope et chronotrope positifs observés et les effets rythmogènes de cette substance par abaissement de gK_2 et du seuil du canal lent calcico-sodique sur des préparations en mauvais état physiologique.

B. MISE EN EVIDENCE D'UNE SUBSTANCE CHOLINERGIQUE DANS LE TISSU MYO-
=====

CARDIQUE ANEURAL DIFFERENCIE IN VITRO.
=====

Le problème de la suppression, temporaire ou définitive, de l'automatisme cardiaque par des excitations électriques a été très étudié dans le cas du coeur adulte (GASKELL, 1883; VINCENZI et WEST, 1963; LU et coll., 1965; CHIANG et LEADERS, 1966; WHITACRE et coll., 1966; ALANIS et BENITEZ, 1967; KENNEDY et WEST, 1967).

Depuis les travaux de BROWN et coll. (1937), on sait que l'excitation des fibres parasympathiques entraîne la libération d'une substance chimique qui provoque l'inhibition des battements cardiaques. BROWN et ECCLES (1934) ont montré que l'atropine bloque les effets de la stimulation vagale et ceux de l'administration directe de l'acétylcholine sur les auricules de lapin. La suppression momentanée de l'activité après une période d'entraînement électrique est généralement attribuée à l'effet chronotrope négatif de l'acétylcholine libérée par les terminaisons nerveuses cholinergiques intracardiaques lors des stimulations. Cependant, des travaux effectués sur le coeur isolé de lapin par BRISCOE et BURN (1954) et par DAY (1956) conduisent à penser que la libération d'une substance d'origine myocardique apparentée à l'acétylcholine est libérée au cours de l'activité spontanée ou lors de la stimulation électrique du ventricule.

OBRECHT-COUTRIS et CORABOEUF (1967) ont étudié les effets de l'administration d'acétylcholine à des fragments de coeurs embryonnaires de poulet placés en

culture in vitro. Ces auteurs ont montré que les fragments innervés, provenant de coeurs d'embryons de 5 et 6 jours d'incubation présentent une sensibilité plus grande au médiateur que les fragments myocardiques non innervés. Sur les explants myocardiques prélevés avant l'établissement de l'innervation cardiaque, l'administration d'acétylcholine produit, selon la concentration de cette substance, un effet biphasique: un effet inhibiteur potentialisé par l'ésérine et annulé par l'atropine suivi secondairement d'un effet accélérateur dans le cas d'application de concentrations élevées en acétylcholine. Pour des doses faibles l'acétylcholine a un effet nicotinique qui n'est jamais suivi d'un effet muscarinique. L'acétylcholine ne produit aucune altération nette du décours du P.A.; par contre, la pente de dépolarisation diastolique est diminuée, ce qui conduit à une diminution du rythme cardiaque. L'ensemble de ces résultats est représenté par la figure 35 empruntée à ces auteurs.

OBRECHT-COUTRIS, CORABOEUF et G. LE DOUARIN (1966, 1968) OBRECHT-COUTRIS, G. LE DOUARIN et CORABOEUF (1964), CORABOEUF, G. LE DOUARIN et OBRECHT-COUTRIS (1970a et b) ont obtenu, sur le coeur de l'embryon de poulet en culture in vitro, une inhibition des contractions cardiaques après entraînement électrique de la préparation à un rythme supérieur au rythme spontané. Les effets post-stimulatifs de l'entraînement électrique sont supprimés par l'atropine et potentialisés par l'ésérine.

L'entraînement électrique du coeur embryonnaire de poulet de 3 jours d'incubation produisant une diminution progressive de la pente de dépolarisation diastolique des cellules directrices puis, à l'arrêt de la stimulation, une inhibition post-stimulative (IPS), on pouvait se demander si un tel phénomène se retrouverait dans d'autres tissus cardiaques aneuxaux doués d'autorythmicité. L'étude de fragments ventriculaires de coeur de grenouille rendus automatiques par l'action du chlorure de baryum fournit un élément de réponse à cette question. En effet, G. LE DOUARIN, RENAUD, LIGNON et NANOT (1968) ont montré qu'une telle préparation présentait des effets post-stimulatifs comparables à ceux qui sont observés sur le coeur embryonnaire de poulet.

Nous nous sommes demandés si de tels effets pouvaient également s'observer sur du tissu myocardique différencié en culture in vitro en milieu liquide à partir

du mésoderme précardiaque. Pour celà, nous avons appliqué la méthode expérimentale de OBRECHT-COUTRIS, G. LE DOUARIN et CORABOEUF à notre matériel aneural.

I. - Effets de l'entraînement électrique des préparations myocardiques différenciées en culture in vitro.

Les préparations sont entraînées par des chocs cathodiques.

1 - Les modifications de l'activité électrique.

Pendant la stimulation électrique, la pente de dépolarisation diastolique décroît progressivement. Pour un nombre de chocs suffisant, variant de 25 à 40 selon les préparations, et pour une fréquence de stimulation suffisamment élevée (de 100 à 150 stimulations par minute), la pente diastolique est totalement supprimée (Fig. 36).

Après la période d'entraînement électrique, la durée de l'inhibition des contractions est variable et la reprise du rythme antérieur des contractions spontanées se fait progressivement. La pente de dépolarisation diastolique récupère peu à peu sa valeur initiale en même temps que la fréquence d'apparition des P.A. augmente (Fig. 36). Durant la stimulation et pendant l'I.P.S., le seuil de déclenchement du PA ne semble pas varier.

Le traitement préalable des préparations par le sulfate d'atropine à la concentration de 10^{-6} mM supprime ou réduit considérablement les effets inhibiteurs stimulatifs de l'entraînement électrique (Fig. 37). Notons que l'administration d'atropine produit le plus souvent une accélération du rythme spontané des préparations.

Ces résultats suggèrent donc que l'entraînement électrique à un rythme rapide libère une substance cholinergique dont les effets chronotropes négatifs sont supprimés par un prétraitement à l'atropine de la préparation.

2 - Facteurs influant sur la durée de l'I.P.S.

Nous avons étudié la durée de l'inhibition post-stimulative en fonction de deux paramètres:

- d'une part en fonction du rythme spontané de la préparation,
- d'autre part en fonction du rapport $\frac{\text{rythme imposé}}{\text{rythme spontané}}$ pour un même nombre de chocs électriques (30 chocs).

a.) Durée de l'I.P.S. en fonction du rythme spontané.

Lorsqu'un nombre constant de chocs (30) est délivré à la même fréquence (140 par minute) à diverses préparations, la durée de l'I.P.S. est d'autant plus longue que le cycle spontané est plus court (Fig. 38). Dans ces conditions, la durée de l'I.P.S. est fonction du rythme spontané. Le tableau VI indique les variations de la durée de l'I.P.S. en fonction du rythme spontané

Rythme spontané (nombre de contrac- tions par minute)	Durée de l'I. P. S. (en ms.)	Rythme spontané (nombre de contrac- tions par minute)	Durée de l'I. P. S. (en ms.)
88	550	41	4 300
87	350	40	2 100
81	610	40	3 810
64	1 250	37	5 150
57	1 260	34	4 400
50	1 850	34	3 780
46	2 500	32	3 150
42	3 800	31	3 260

Tableau VI

Durée de l'inhibition post-stimulative en fonction du rythme spontané
(fréquence des chocs: 140/mn - Nombre de chocs délivrés: 30). Valeurs
individuelles de 16 expériences.

b.) Durée de l'I.P.S. en fonction du rapport $\frac{\text{rythme imposé}}{\text{rythme spontané}}$.

Pour un nombre déterminé de stimulations électriques (30), la durée de l'I.P.S. varie en fonction de la valeur du rapport $\frac{\text{rythme imposé}}{\text{rythme spontané}}$.

Lorsque ce rapport augmente, la durée de l'I. P. S. croît. Le tableau VII et la figure 38 rendent compte des variations de la durée de l'inhibition post-stimulative en fonction du rapport des fréquences.

<u>Rythme imposé</u> Rythme spontané	Durée de l'I. P. S. (en ms)	<u>Rythme imposé</u> Rythme spontané	Durée de l'I. P. S. (en ms)
1,81	1 950	3,07	3 120
1,83	1 800	3,08	3 580
2,07	1 250	3,43	4 150
2,31	1 255	4,03	3 350
2,43	2 625	4,42	3 920
2,56	1 910	4,50	3 810
2,60	2 290	4,72	4 630
2,90	3 100	5,07	4 360
3,05	3 910	6,25	5 188

Tableau VII

Durée de l'I. P. S. en fonction du rapport entre le rythme imposé et le rythme spontané (nombre de chocs délivré: 30). Valeurs individuelles de 18 expériences.

Les résultats obtenus par l'entraînement électrique du tissu myocardique aneural différencié en culture in vitro présentent une analogie avec les résultats obtenus par OBRECHT-COUTRIS, G. LE DOUARIN et CORABOEUF (1964) sur des fragments de coeurs embryonnaires de poulet de 3 jours d'incubation et qui ont amené ces auteurs à penser que l'inhibition post-stimulative pouvait être due à la libération d'acétylcholine endogène. En 1968, ces mêmes auteurs ont pu apporter la preuve directe de l'existence d'acétylcholine endogène.

Nous avons cherché à mettre en évidence, par des techniques histochimiques, l'existence dans les cellules myocardiques non innervées des enzymes intervenant

dans la dégradation de l'acétylcholine, c'est-à-dire la présence d'activités cholinestérasiques et en particulier acétylcholinestérasique spécifique.

II. - Activités cholinestérasiques du tissu myocardique aneural.

Il est important de noter que, jusqu'à présent, on ne dispose pas de technique histochimique permettant de détecter l'acétylcholine; c'est pourquoi on étudie l'activité cholinestérasique. En effet, les activités acétylcholinestérasiques sont, dans un tissu donné, très probablement concentrées près des structures libérant l'acétylcholine. Cette relation qualitative n'implique d'ailleurs pas un parallélisme rigoureux entre la quantité d'acétylcholine présente et l'intensité de l'activité acétylcholinestérasique.

Nous avons cherché à mettre en évidence l'acétylcholinestérase spécifique et les cholinestérases non spécifiques qui diffèrent par leur spécificité de substrat. Nous avons utilisé pour cela la méthode de GEREBTZOFF (1953, 1956), qui est une variante de celle de KOELLE et FRIEDENWALD (1949) et a été adaptée au coeur embryonnaire par CREPIN et G. LE DOUARIN (1966). Le principe de la visualisation des activités cholinestérasiques consiste en l'hydrolyse in situ d'un substrat par les cholinestérases du tissu étudié. Les tissus sont fixés au formol-calcium de BAKER (1944) à pH 7, pendant 30 minutes à 1 heure à la température de 4°C, puis subissent une post-fixation de 30 minutes dans une solution de formol neutre à 10 %. A l'issue de cette post-fixation, le formol est éliminé par rinçage des pièces à l'eau distillée. Selon le type d'activité cholinestérasique à mettre en évidence, on utilise deux substrats:

- l'acétylthiocholine pour la mise en évidence de l'activité acétylcholinestérasique spécifique,

- la butyrylthiocholine pour la mise en évidence des cholinestérases non spécifiques.

La solution substrat est préparée de la façon suivante:

- iodure d'acétylthiocholine 15 mg
- ou iodure de butyrylthiocholine 18,5 mg
- solution de sulfate de cuivre 0,1 M 0,26 ml
- eau distillée 0,78 ml

Cette solution est centrifugée à 4 000 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant est prélevé et constitue la solution substrat définitive.

Les pièces sont incubées à 37°C pendant 2 heures pour la mise en évidence de l'activité acétylcholinestérasique et pendant 16 à 18 heures pour l'activité cholinestérasique dans un milieu contenant:

- tampon acétate, acide acétique pH 5,5 2,5 ml
- solution de glycolle à 3,75 % 0,1 ml
- solution de sulfate de cuivre 0,1 M 0,1 ml
- eau distillée 1,9 ml
- solution de substrat définitive 0,4 ml.

La thiocholine libérée par l'hydrolyse enzymatique se combine au cuivre pour former un composé cuivrique, mercaptide insoluble. Le composé cuivrique obtenu après incubation est transformé en sulfure cuivrique après un traitement par du sulfure d'ammonium à 1 % durant 10 minutes. Après des lavages répétés à l'eau distillée les coupes sont montées au baume. Les aliestérases pouvant interférer avec les cholinestérases lors de la réaction histochimique, nous avons fait des contrôles en remplaçant dans le milieu d'incubation l'eau distillée par le même volume d'une solution de sulfate d'ésérine à 1,7 mg pour 100 ml. A cette concentration, l'ésérine inhibe les cholinestérases, mais reste sans effet sur les autres estérases (VERNE, 1954; CHESSICK, 1954).

Le milieu d'incubation contenant le substrat a été testé sur ces coupes de coeur d'embryon de poulet de 12 jours d'incubation traitées dans les mêmes conditions que les tissus à étudier (Fig. 39 A et B).

1 - Activité cholinestérasique des tubes cardiaques d'embryons de 2 jours d'incubation.

L'expérience a porté sur 28 tubes cardiaques d'embryons de 2 jours d'incubation.

- Les 15 tubes cardiaques soumis à la réaction utilisant comme substrat l'acétylthiocholine montrent l'existence d'une activité cholinestérasique spécifique se manifestant d'une part sous forme de sites localisés surtout dans les régions moyenne et postérieure du tube cardiaque et d'autre part par des précipités bruns dispersés au sein du tissu myocardique. La figure 39 C montre ces deux types d'activité.

- L'activité cholinestérasique non spécifique recherchée dans 13 tubes cardiaques est moins localisée que l'activité spécifique et se manifeste par des précipitations diffuses au sein du tissu myocardique (Fig. 39 D). Lorsque l'activité enzymatique se présente sous forme de sites, ceux-ci sont toujours petits et à contours mal définis. Cette observation rejoint celle de CREPIN (1966), mentionnée pour des coeurs embryonnaires au 4ème jour de l'incubation.

2 - Activité cholinestérasique des tubes cardiaques différenciés en culture in vitro.

Les réactions histochimiques ont porté sur 36 tubes cardiaques dont 17 ont été utilisées pour la mise en évidence de l'activité spécifique et 19 pour celle de l'activité non spécifique. Les tubes cardiaques sont extraits de leur vésicule avant d'être fixés.

- Quel que soit le stade de développement atteint par l'embryon au moment de l'explantation de l'aire cardiaque totale (comprenant les feuillets ectodermique, mésodermique et endodermique), nous avons trouvé des sites acétylcholinestérasiques. Ceux-ci se présentent sur les coupes par des précipités bruns à contours assez nets rappelant en celà l'activité cholinestérasique spécifique des tubes cardiaques d'embryons au 2ème jour de l'incubation (Fig. 39 E).

- L'activité cholinestérasique non spécifique a été révélée dans les 19 tubes soumis à la réaction histochimique. Cette activité se manifeste rarement sous forme

de sites localisés ; elle est le plus souvent diffuse et importante tant en intensité qu'en répartition dans le tissu myocardique (Fig. 39 F).

3 - Activité cholinestérasique du tissu myocardique différencié en culture in vitro à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque.

Quel que soit le stade de développement de l'embryon au moment de l'explantation (stade présomitique à 3 somites) le tissu myocardique différencié en culture in vitro en milieu liquide, présente une activité cholinestérasique.

- L'activité acétylcholinestérasique recherchée dans 17 explants cultivés pendant 4 jours se présente sous forme de sites bien délimités, de tailles variables et disséminés dans le tissu myocardique (Fig. 39 G). Toutefois, dans le cas d'explants en survie, mais ne présentant plus de contractions après 22 jours de culture, l'activité acétylcholinestérasique spécifique est plus diffuse.

- Les explants ont été fixés après 21 et 22 jours de culture dans le milieu liquide de RINALDINI. Certains de ces explants (8 cas) présentaient encore une activité mécanique spontanée; d'autres (5 cas), au contraire, avaient cessé de se contracter tout en restant sains.

Dans l'un et l'autre cas, l'activité cholinestérasique non spécifique se visualise de la même façon. Cette activité est toujours intense et intéresse l'ensemble du tissu myocardique (Fig. 39 H). Nous n'avons jamais observé de site à contours bien délimités. Il n'est toutefois pas possible de conclure avec certitude à une généralisation de l'activité cholinestérasique non spécifique à l'ensemble de l'explant, un artefact de diffusion des produits de réaction pouvant toujours se produire malgré les précautions techniques prises.

III - Conclusions.

Par les expériences réalisées, nous avons montré que la différenciation cellulaire du mésoderme précardiaque placé en culture in vitro s'accompagne d'une différenciation biochimique se traduisant par la synthèse de cholinestérases. En effet, le mésoderme précardiaque au moment de l'explantation ne présente pas d'activité

cholinestérasique (CREPIN et G. LE DOUARIN, 1966). De même, nous avons pu montrer dans les tubes cardiaques différenciés in vitro l'existence des deux types d'activité cholinestérasiques comparables à celles que nous avons observées dans le cas des tubes cardiaques in situ au 2ème jour d'incubation. Si l'on admet que les enzymes spécifiques sont proches des structures libérant le substrat, la mise en évidence des activités acétylcholinestérasiques spécifiques et non spécifiques apporterait une preuve de l'existence d'une substance cholinergique -pouvant être de l'acétylcholine- dans les tubes cardiaques non innervés et dans les tissus myocardiques différenciés en culture in vitro. L'activité acétylcholinestérasique se présente le plus souvent sous la forme de sites à contours bien délimités, alors que les activités cholinestérasiques non spécifiques sont généralement diffuses ou, lorsque des sites existent, ils sont toujours petits et à contours mal définis.

L'apparition d'une activité cholinestérasique et, en particulier, de l'activité acétylcholinestérasique, est en faveur de l'hypothèse de l'intervention de l'acétylcholine endogène dans l'activité spontanée du myocarde aneural.

Une autre preuve indirecte de la présence d'acétylcholine dans les tissus non innervés est apportée par les expériences mettant en évidence l'existence de l'inhibition post-stimulative qui fait suite à un entraînement à rythme rapide de la préparation. L'interprétation de ce résultat fait appel à une série d'expériences concernant les problèmes de l'innervation cholinergique du coeur et à la transmission synaptique. On sait que l'excitation des fibres parasympathiques entraîne l'inhibition des battements cardiaques et que l'atropine bloque les effets de la stimulation vagale. La substance libérée est identifiée à l'acétylcholine.

BARDY (1964), DEL CASTILLO et KATZ (1955 a et b), puis HUTTER et TRAUTWEIN (1955) par la technique des microélectrodes intracellulaires ont étudié l'influence de la stimulation parasympathique sur l'activité électrique des myoblastes cardiaques de grenouille. Ces auteurs ont observé pendant la stimulation un arrêt des battements cardiaques, une hyperpolarisation transitoire des fibres responsables de l'automatisme, une chute de la pente de dépolarisation diastolique et une reprise progressive du rythme initial de la préparation après stimulation.

Les résultats que nous obtenons sur le tissu myocardique différencié en culture in vitro à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque présentent une analogie marquée avec les résultats de ces auteurs et avec ceux obtenus par OBRECHT, G. LE DOUARIN et CORABOEUF (1964), par OBRECHT-COUTRIS, CORABOEUF et G. LE DOUARIN (1966-1968) sur le coeur embryonnaire de poulet, ainsi qu'avec ceux obtenus par G. LE DOUARIN, RENAUD, LIGNON et NANOT (1968) sur la pointe ventriculaire de grenouille rendue automatique par le chlorure de baryum.

Cependant, dans le cas de notre préparation, l'hyperpolarisation transitoire observée sur l'activité électrique des cellules sinusales de grenouille n'apparaît pas. Après la stimulation on observe, tant dans le cas de l'excitation vagale du sinus veineux de grenouille que par la stimulation directe du coeur embryonnaire de poulet, de la pointe ventriculaire de grenouille et de nos explants, une reprise progressive du rythme initial des battements après l'arrêt de la stimulation, ainsi qu'une récupération progressive de la valeur de la pente de dépolarisation diastolique.

Des phénomènes tout à fait semblables à ceux qui sont produits par la stimulation vagale ont été obtenus par application directe d'acétylcholine sur le muscle auriculaire de chat (BURGEN et TERROUX, 1953) et sur le sinus veineux de grenouille (DEL CASTILLO et KATZ, 1955 a). Ces résultats ont amené OBRECHT, G. LE DOUARIN et CORABOEUF (1964) à penser que les effets obtenus par stimulation du coeur embryonnaire de poulet non innervé pouvaient être dus à la libération de réserves d'acétylcholine endogène. Ces auteurs ont pu apporter par la suite (1968, 1970a et b) une preuve directe de l'existence d'acétylcholine endogène dans les myoblastes cardiaques de poulet avant le stade de l'innervation. Ils ont pu déterminer qu'un coeur embryonnaire de poulet au 3ème jour de l'incubation battant spontanément libre environ 10^{-10} g/heure d'acétylcholine. Ce même coeur entraîné électriquement à un rythme supérieur au rythme spontané libre environ 10^{-9} g/heure d'acétylcholine, l'augmentation étant donc d'un facteur 10.

L'ensemble de ces résultats concordants nous permet de penser que l'inhibition post-stimulative supprimée par un traitement préalable à l'atropine, observée

dans le cas du tissu myocardique aneural différencié in vitro, est dépendante de l'acétylcholine endogène. Les réactions histochimiques réalisées sur ce matériel corroborent cette hypothèse.

L'interprétation de l'inhibition des contractions cardiaques observée après la stimulation électrique peut être cherchée en se référant à l'action de l'acétylcholine sur les perméabilités membranaires.

Pour HOFFMANN et SUCKLING (1953) l'acétylcholine diminue la perméabilité membranaire au sodium et limite l'entrée de ces ions dans la cellule. Mais de nombreux travaux (HUTTER et TRAUTWEIN, 1956; TRAUTWEIN, KUFFLER et EDWARDS, 1956; TRAUTWEIN et DUDEL, 1958; HUTTER et NOBLE, 1960; NOBLE, 1960, 1962; ...) ont établi que les effets chronotropes négatifs de l'acétylcholine peuvent être rapportés à une augmentation de la conductance membranaire aux ions potassium. HARRIS et HUTTER (1956) ont montré par l'utilisation d'ions marqués, que sous l'influence de l'acétylcholine la perméabilité potassique était accrue. Par la mesure directe des courants transmembranaires par la technique du "sucrose-gap" de STÄMPFLI (1954) appliquée à de fines trabécules isolées de l'oreillette de grenouille, GARNIER et ROUGIER (1969) ont confirmé l'augmentation de la conductance potassique par l'acétylcholine. La suppression des courants entrants sodiques et calciques par la TTX et les ions Mn^{2+} a permis de voir que l'augmentation de gK^{+} produite par l'acétylcholine est due essentiellement à une diminution de la rectification anormale, alors que la rectification retardée n'est pas affectée. L'acétylcholine agirait en augmentant la conductance gK_1 selon la nomenclature empruntée à NOBLE (1962).

La stimulation électrique de la préparation à un rythme rapide libérant l'acétylcholine endogène entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions K^{+} et fait chuter la pente de dépolarisation lente diastolique. Lorsque l'effet de l'acétylcholine s'estompe, la perméabilité potassique retrouve progressivement sa valeur initiale et la pente de dépolarisation diastolique croît.

Troisième partie :

=====

INFLUENCE DES CONDITIONS IONIQUES DU
MILIEU SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE CELLULAIRE.

A. - Actions des variations de la concentration externe en ions sodium.

- I - Action d'un milieu hyposodique sur le rythme cardiaque aux jeunes stades du développement.
- II - Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire.
- III - Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique du tissu myocardique en culture in vitro.
- IV - Conclusions.

B. - Effets des milieux hypocalciques sur l'activité électrique cardiaque embryonnaire.

- I - Effets des milieux hypocalciques sur l'activité électrique ventriculaire du coeur in situ.
- II - Effets des milieux hypocalciques sur l'activité électrique du tissu myocardique en culture in vitro.
- III - Conclusions.

C. - Effets des milieux hypopotassiques sur l'activité électrique cardiaque embryonnaire.

- I - Effets des milieux hypopotassiques sur l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire in situ.
- II - Effets des milieux hypopotassiques sur l'activité électrique du tissu myocardique cultivé in vitro.
- III - Conclusions.

On sait que les concentrations ioniques entre l'intérieur et l'extérieur des cellules sont inégales. Ces différences de concentration déterminent des piles de concentration et les variations du potentiel cellulaire dépendent alors des perméabilités sélectives à ces ions. Pour la plupart des tissus excitables, l'amplitude du potentiel d'action est sous la dépendance de la concentration en sodium extracellulaire, de telle façon qu'au maximum de la dépolarisation, la membrane se comporte comme une électrode au sodium. Nous avons vu (HISTORIQUE de ce travail) que certains tissus cardiaques (ventricule de cobaye de lapin, de rat embryonnaire, de tortue et de grenouille) présentent au cours de la phase ascendante du P.A. une perméabilité aux ions Ca^{2+} . Le potentiel membranaire de repos est considéré comme un potentiel de pile de concentration au potassium. Par ailleurs, les mécanismes ioniques responsables du plateau des réponses cardiaques sont encore très controversés. Les ions bivalents, notamment Ca^{2+} et Mg^{2+} interviennent pour une part importante dans cette phase de maintien de la dépolarisation. La repolarisation membranaire est liée au développement d'un courant sortant, capable à un certain moment de dépasser la valeur des courants entrants lents calciques ou sodiques. D'autre part, au cours de cette phase intervient un second phénomène, suggéré en 1958 par CORABOEUF, ZACOUTO, GARGOUÏL et LAPLAUD. Ces auteurs envisageaient alors l'existence d'une augmentation retardée de la conductance potassique, ce qui fut effectivement mis en évidence par NOBLE (1962, 1966) et dont la cinétique lente conditionne le décours de la repolarisation.

Il apparaît qu'au cours du P.A. diverses espèces ioniques sont impliquées. Il nous a paru intéressant d'étudier les effets de solutions de perfusion de compositions ioniques variées pour analyser l'importance de certains ions sur l'activité électrique du tissu cardiaque embryonnaire de poulet.

Les changements de la composition ionique du liquide de perfusion sont obtenus en modifiant la teneur en ions du liquide de Tyrode. Nous utiliserons, par simplification, les termes de Ty-NaO pour désigner une solution de perfusion obtenue par suppression totale des ions Na^{+} du liquide de Tyrode ou Ty-Na/10 pour une solution où la concentration sodique du liquide de Tyrode sera réduite au 10ème de la concentration normale. Une nomenclature semblable sera utilisée pour les ions

Ca^{2+} (Ty-CaO et Ty-Ca/10) et pour les ions K^{+} (Ty-KO et Ty-K/10). Toutefois, les concentrations ioniques finales sont légèrement différentes de celles qui sont obtenues par modification de la teneur en ions du liquide de Tyrode, du fait de l'addition d'extraits embryonnaires et de sérum de poulain à la solution de perfusion. Les modifications ioniques introduites sont considérées négligeables par rapport à celles créées par les variations de la composition du liquide de Tyrode.

A. ACTION DES VARIATIONS DE LA CONCENTRATION EXTERNE EN IONS SODIUM.

=====

Nous avons utilisé des solutions de perfusion dont le liquide de Tyrode contenait le 10ème de la concentration sodique normale (Ty-Na/10) ou était totalement dépourvu de sodium (Ty-NaO). L'isotonicité du milieu de perfusion est rétablie par l'addition de chlorure de choline. Notons que dans ces conditions l'administration d'atropine aux préparations ne s'est pas avérée indispensable; les résultats obtenus en absence d'atropine sont identiques à ceux qui sont observés après traitement par cette substance.

I. - Action d'un milieu hyposodique sur le rythme cardiaque aux jeunes stades du développement.

L'expérimentation a porté sur des coeurs d'embryons de stades échelonnés de 12 somites au 5ème jour d'incubation. Les coeurs sont prélevés et placés dans du milieu de Rinaldini maintenu dans une enceinte thermostatée à 38°C. Le rythme des contractions cardiaques est noté après stabilisation de la préparation. Les coeurs sont ensuite transférés dans un milieu de RINALDINI à 38°C, dont le liquide de Tyrode ne contient que le 10ème de la concentration sodique normale.

Les effets chronotropes de cette solution appauvrie en ions Na^+ sont observés après 10 minutes de séjour des coeurs dans le milieu. Nous avons tenté de minimiser les variations thermiques en réalisant toutes les manipulations dans une enceinte thermostatée.

Le tableau VIII et la figure 40 indiquent les effets d'un milieu hyposodique (Ty-Na/10) sur le rythme des contractions cardiaques aux jeunes stades du développement.

Aux divers stades étudiés, la diminution en sodium du liquide de perfusion provoque un effet chronotrope négatif. La diminution du rythme des contractions cardiaques est d'autant plus marquée que le coeur est plus différencié. Pour les coeurs d'embryons de 12 somites à 30 somites, le ralentissement du rythme est d'environ 15 %. Au-delà du stade de 30 somites le pourcentage de diminution du rythme des contractions est élevé (40 %).

Stades de développement de l'embryon	% de variation du rythme		Stades de développement de l'embryon	% de variation du rythme
12 à 16 somites	$-9,2^{+0,8}$		30 à 35 somites	$-22,0^{+0,6}$
18 à 23 somites	$-18,8^{+1,2}$		36 à 43 somites (4 jours)	$-42,1^{+1,5}$
24 à 29 somites	$-21,5^{+0,6}$		5 jours	$-58^{+0,4}$

Tableau VIII

Pourcentage de variations du rythme cardiaque en fonction du rythme initial dans un milieu appauvri en sodium (concentration sodique égale au 10ème de la concentration normale).

Remarque : Ce tableau indique les valeurs moyennes des variations du rythme par classe.

Ces résultats montrent un accroissement de la sensibilité du myocarde à la privation sodique au cours du développement. La figure 40 illustre ces résultats et met en évidence l'accroissement d'abord lent de la sensibilité à la privation sodique des stades jeunes du développement (de 12 à 30 somites) et l'apparition d'une sensibilité importante des stades plus avancés de la différenciation cardiaque.

II. - Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire.

Nous nous sommes limités à l'étude des modifications de l'activité électrique ventriculaire des coeurs embryonnaires de 2 jours, 3 jours, 4 jours et 19 jours d'incubation.

a.) Modifications de l'activité électrique du coeur embryonnaire de 2 jours (21 à 28 somites).

La perfusion par des solutions Ty-Na/10 et Ty-Na0 aboutit à des modifications identiques de l'activité électrique cellulaire. La vitesse de la phase ascendante du P.A. diminue et passe de 5,8 V/s à 4,2 V/s après 2 ou 3 minutes de perfusion. Cette diminution de la vitesse de la phase ascendante au cours de l'action conduit à la disparition progressive du plateau et à la réduction de la durée du P.A. L'amplitude du P.A. diminue; le potentiel de repos ne semble pas affecté par la privation sodique et conserve tout au long de l'action une valeur d'environ 55 mV (Fig. 41 A). Toutefois, la perfusion par la solution Ty-Na0 entraîne une suppression plus précoce de l'activité électrique (après 15 mn environ de perfusion) qu'une solution appauvrie en cet ion (Ty-Na/10) où l'activité électrique persiste durant 30 mn environ. Il semble donc que dès ce stade, la participation du sodium à l'activité électrique soit importante chez l'embryon de poulet, ce qui n'est pas le cas pour l'embryon de rat de 10 jours.

Les effets obtenus en milieu hyposodique sont parfaitement réversibles: la perfusion de la préparation par un milieu normal permet la complète restauration de l'activité électrique.

b.) Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique du coeur embryonnaire de 3 jours (stade 30 à 40 somites).

Les modifications du décours de l'activité électrique sont comparables à celles qui ont été décrites pour les stades plus précoces; la vitesse de la phase ascendante diminue, le plateau disparaît et l'amplitude du P.A. est fortement diminuée (Fig. 41 B).

Cependant, par rapport aux résultats obtenus sur le coeur embryonnaire de 2 jours, les effets de la déficience sodique du milieu de perfusion sont d'apparition plus précoce. En effet, la perfusion par la solution Ty-Na/10 conduit à l'arrêt de l'activité après 10 à 15 minutes de perfusion par cette solution.

Au stade de 3 jours du développement embryonnaire, l'activité électrique cellulaire apparaît davantage dépendante de la concentration sodique externe que celle du coeur au 2ème jour de l'incubation.

Notons que les effets obtenus sont parfaitement réversibles après le retour au milieu de perfusion normal.

c.) Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique du coeur embryonnaire de 4 jours.

Les modifications de l'activité électrique cellulaire produites par la diminution du sodium extracellulaire apparaissent encore plus précocement qu'au stade précédent. La perfusion par la solution Ty-Na0 ne permet un maintien de l'activité électrique cellulaire que pendant 5 minutes environ. Dans une solution Ty-Na/10 l'activité spontanée persiste pendant 15 minutes. Le décours du P.A. présente les altérations signalées pour les autres stades et sont représentées sur la figure 42 A.

La sensibilité de l'activité électrique à la privation de sodium du milieu de perfusion augmente donc au cours du développement embryonnaire. Elle apparaît plus importante à ce stade du développement qu'aux stades antérieurs.

d.) Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique du coeur embryonnaire de 19 jours.

Les préparations sont stimulées électriquement à la fréquence de 30 chocs par minute. Les milieux Ty-Na0 entraînent un arrêt précoce de l'activité électrique qui survient généralement après 5 à 10 minutes de perfusion. La persistance de l'apparition des P.A. pendant 15 minutes environ peut être obtenue en perfusant par la solution Ty-Na/10.

Le P.A. subit les modifications déjà décrites pour les autres stades. L'amplitude et la vitesse de la phase ascendante chutent rapidement. La durée du P.A. diminue. Le potentiel membranaire de repos conserve sa valeur initiale d'environ 65 à 75 mV. La figure 42 B montre les modifications du décours du P.A. sous l'influence des milieux hyposodiques.

L'augmentation de la sensibilité à la privation sodique au cours du développement paraît atteindre son maximum au 4ème jour de l'incubation, puisqu'au 19ème jour les modifications de l'activité électrique et son maintien sont identiques à ceux qui sont obtenus sur le myocarde ventriculaire de l'embryon de 4 jours.

III. - Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique du tissu myocardique en culture in vitro.

Des fragments ventriculaires de coeur d'embryons de 4 jours d'incubation placés en culture sur milieu gélosé présentent une activité spontanée (OBRECHT, G. LE DOUARIN et CORABOEUF, 1964; CORABOEUF, G. LE DOUARIN et OBRECHT, 1965). L'automatisme, d'abord limité à un petit nombre de cellules, tend à se généraliser après quelques jours de culture. Nous avons pensé qu'il était intéressant, compte tenu des résultats obtenus sur le coeur de l'embryon de 4 jours in situ, d'étudier si la généralisation de l'automatisme à l'ensemble du fragment entraîne un changement dans la sensibilité aux ions impliqués dans l'activité électrique.

Dans un même ordre d'idée, nous avons étudié l'action des milieux déséquilibrés en ions sur le tissu myocardique différencié en culture in vitro en milieu liquide, à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque.

1 - Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique des fragments ventriculaires de coeurs embryonnaires de 4 jours placés en culture in vitro.

Les fragments ventriculaires sont placés en culture in vitro dans le milieu liquide de RINALDINI. Après 3 à 4 jours, les explants sont adhérents à la lamelle de verre placée au fond du récipient de culture et peuvent être transférés dans la cuve à perfusion. Nous avons étudié les modifications de l'activité électrique cellulaire produits par les milieux hyposodiques après 4 jours et 11 jours de culture. Les résultats obtenus sont rigoureusement identiques.

Très précocement, les solutions Ty-Na/10 ou Ty-Na0 produisent une diminution très marquée de la vitesse de la phase ascendante du P.A. et une réduction de la

durée du P.A. (Fig. 43 A). Le potentiel membranaire de repos reste stable (50 à 60 mV). L'activité spontanée est supprimée en 2 à 3 minutes dans les milieux Ty-Na0 et ne peut être maintenue au-delà de 5 minutes dans les milieux où la concentration sodique est réduite (Ty-Na/10).

Il apparaît donc que dans les conditions de la culture in vitro le tissu myocardique ventriculaire d'embryons de 4 jours conserve ses propriétés membranaires à l'égard du sodium quel que soit le temps de culture. Nous reviendrons ultérieurement sur cet aspect de la question.

2 - Effets de milieux hyposodiques sur l'activité électrique du tissu myocardique différencié en culture in vitro.

Le tissu myocardique différencié en culture in vitro en milieu liquide à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque ne présente que des P.A. du type ventriculaire. Au cours de la culture on assiste à une généralisation de l'automatisme à l'ensemble de l'explant (1ère partie, chapitre B II).

Les modifications produites par les milieux hyposodiques diffèrent nettement de celles qui sont observées dans le cas des fragments ventriculaires d'embryons de 4 jours d'incubation placés dans les mêmes conditions de culture.

En effet, les altérations de l'activité électrique cellulaire, à la suite d'une réduction du sodium extracellulaire, apparaissent plus tardivement. On observe tout d'abord une diminution de la durée des P.A. dès la première minute de perfusion par une solution Ty-Na/10. La vitesse de la phase ascendante du P.A., lente sur ces préparations (4,7 V/s), n'est pas modifiée. La diminution de l'amplitude du P.A. intervient après 5 minutes de perfusion par le milieu hyposodique et se poursuit jusqu'à la suppression de l'activité (Fig. 43 B). L'activité électrique est maintenue pendant 20 minutes environ, alors que dans les solutions Ty-Na0 elle n'excède jamais 10 minutes. Le potentiel membranaire de repos conserve sa valeur (60 mV) tout au long de l'expérience et le retour au milieu normal permet la reprise de l'activité électrique normale.

L'activité électrique du tissu myocardique différencié en culture in vitro présente une sensibilité à la privation sodique qui rappelle celle des coeurs embryonnaires aux stades précoces du développement (embryons de 2 jours).

IV. - Conclusions.

Les premiers travaux effectués à l'échelle cellulaire sur l'action des milieux hyposodiques sont dus à DRAPER et WEIDMANN (1951). Ces auteurs observent que dans une solution contenant 13 % de la concentration sodique normale l'amplitude du P.A. du tissu conducteur de coeur de chien diminue et que la réponse est raccourcie. De nombreux travaux ont confirmé ce résultat sur d'autres tissus cardiaques. Cependant, d'autres expériences et notamment celles de CORABOEUF et OTSUKA (1956), sur le tissu myocardique ventriculaire de cobaye placé dans une solution contenant 25 % de la quantité normale de sodium, montrent que dans ce cas l'amplitude du P.A. n'est pratiquement pas modifiée après 45 minutes et que le potentiel membranaire de repos reste inchangé. NIEDERGERKE et ORKAND (1966 b) observent que l'inversion du potentiel au niveau du myocarde de grenouille est réduit quand la concentration externe en sodium est diminuée; cependant, cette diminution n'est que de 17,3 mV au lieu des 58 mV prévus par la théorie ionique. ROUGIER (1968) confirme ce résultat. CORABOEUF, GALAND, WALLON et GARGOUÏL (1959) et WALLON, CORABOEUF et GARGOUÏL (1959) ont comparé les effets d'un milieu appauvri en sodium sur deux types de tissus ventriculaires de Mammifères: le ventricule de cobaye et celui de lapin d'une part et le ventricule de rat d'autre part à 37°C et à 24°C. Les résultats montrent que le ventricule de lapin se comporte en milieu hyposodique comme celui de cobaye tant à 24°C qu'à 37°C, mais que le ventricule de rat à 24°C, dont le P.A. est sigmoïde, présente une baisse marquée de l'amplitude de la phase ascendante et du plateau. Corrélativement, les effets inotropes positifs sont moins importants chez le rat que chez le cobaye (CORABOEUF et GUILBAULT, 1960). Pour ces auteurs, le tissu ventriculaire de rat adulte se comporte comme une électrode au sodium au moment de la dépolarisation.

Le ventricule de rat embryonnaire montre un comportement différent. BERNARD et GARGOUÏL (1968 a), BERNARD, RAYMOND, GROS et GARGOUÏL (1968 c, 1969),

BERNARD (1970 a) et BERNARD et GARGOUIL (1970 b) ont montré que la variation d'amplitude du P.A. en fonction de la concentration externe en ions sodium ne suit pas la théorie ionique. A 10 jours post-cortum, l'activité électrique ventriculaire n'est pas modifiée par les variations de concentration sodique externe et de 13 jours à la naissance, le myocarde ventriculaire se comporte dans les solutions hyposodiques comme celui de la grenouille. Pour ces auteurs, l'ion sodium ne doit pas être le seul à intervenir dans le développement de la phase ascendante du P.A. du myocarde embryonnaire de rat comme l'ont précisé sur le myocarde de grenouille NIEDERGERKE et ORKAND (1966 b) et ROUGIER (1968). Le calcium, présentant une pile de concentration de + 160 mV (REUTER, 1967), pourrait intervenir dans la dépolarisation du P.A. du coeur embryonnaire.

Les résultats que nous obtenons sur le ventricule de l'embryon de poulet semblent différents de ceux qui sont observés chez l'embryon de rat. En effet, dès le 2ème jour de l'incubation les milieux hyposodiques entraînent très rapidement les modifications classiques de l'activité électrique (diminution de l'amplitude du P.A., raccourcissement de sa durée, ralentissement de la phase ascendante). Il semble donc que dès ce stade, la participation du sodium à l'activité électrique soit importante. Cependant, au cours du développement cardiaque, on assiste à une évolution de la sensibilité du myocarde aux solutions hyposodiques suggérant une participation de plus en plus grande des ions sodium dans la genèse de l'activité électrique.

Cette évolution de la sensibilité aux ions sodium au cours de l'ontogenèse pose le problème de l'intervention possible d'une autre espèce ionique au cours de la phase de dépolarisation du P.A. ventriculaire aux jeunes stades du développement et dans l'activité électrique du tissu myocardique différencié en culture in vitro. Les données bibliographiques nous conduisent à envisager la participation éventuelle des ions Ca^{2+} dans la genèse de l'activité électrique à ces stades de la différenciation cellulaire cardiaque. Afin d'éprouver le rôle du calcium dans l'électrogenèse cardiaque ventriculaire, nous nous proposons d'étudier les effets produits par les variations de concentration de cet ion dans le milieu externe sur l'activité électrique cellulaire.

B. EFFETS DES MILIEUX HYPOCALCIQUES SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE

CARDIAQUE EMBRYONNAIRE.

L'action des variations de la concentration externe des ions Ca^{2+} sur les potentiels membranaires cardiaques produit des effets variables avec le matériel étudié. Les premières expériences sont dues à TRAUTWEIN et WITT (1952) sur le coeur de grenouille. Ces auteurs constatent que les milieux hypocalciques diminuent la durée du P.A. par raccourcissement du plateau et qu'ils entraînent en outre une légère hyperpolarisation. Par contre, WARE, BENNETT et Mc INTYRE (1955) trouvent que les milieux hypocalciques sont sans effet sur l'activité électrique cellulaire, alors que HOFFMAN et SUCKLING (1956) sur le muscle papillaire, puis CORABOEUF et GARNIER (1960 et 1961) sur le ventricule de cobaye montrent que de tels milieux allongent le plateau du P.A. tout en diminuant l'amplitude. NIEDERGERKE et ORKAND (1966a) mettent en évidence par action de diverses concentrations calciques sur des lambeaux de coeur de grenouille, une relation entre l'importance de l'inversion de potentiel et la concentration calcique externe. Ces auteurs suggèrent une entrée des ions Ca^{2+} au travers des membranes excitables qui pourraient contribuer au courant ionique entrant responsable de la phase ascendante du P.A. Cette hypothèse a été éprouvée par de multiples travaux. Ainsi, ROUGIER, VASSORT, GARNIER, GARGOUÏL et CORABOEUF (1968 a et 1969); ROUGIER, VASSORT et GARNIER (1968) par l'application de la technique du "sucrose-gap" à l'étude du P.A. auriculaire de grenouille ont montré que le courant ionique intervenant pendant la phase ascendante du P.A. est constitué de deux composants. Une première partie de la phase ascendante du P.A. est due à un courant entrant de cinétique rapide suivie d'une deuxième phase de courant entrant de cinétique lente, transporté dans les conditions normales, par les ions sodium et calcium de façon compétitive.

Cette participation des ions Ca^{2+} à la genèse de la phase ascendante du P.A. n'est pas limitée au coeur de grenouille. Elle a pu être montrée dans le cas du myocarde de cobaye et de rat adultes (CORABOEUF et VASSORT, 1967 et 1968) sur le tissu auriculaire d'axolotl (BERNARD, GARGOUÏL, ROUGIER, RAYMOND et

GARNIER, 1968 b) sur le centre d'automatisme du coeur de lapin (LENFANT, MIRONNEAU, GARGOUÏL et GALAND, 1958; MIRONNEAU, LENFANT et DRAMANE, 1969; LENFANT et MIRONNEAU, 1970), sur des fragments ventriculaires de coeur de chien (REUTER et BEELER, 1969 b) et dans le cas du tissu ventriculaire embryonnaire de rat (BERNARD et GARGOUÏL, 1968 a et 1970 b; BERNARD, RAYMOND, GROS et GARGOUÏL, 1968 c et 1969; BERNARD, 1970 a). Sur ce dernier matériel, le P.A. ventriculaire du coeur jeune (embryon de 10 jours post-coïtum) est essentiellement dû à un courant entrant calcique. Au chapitre concernant l'intervention des ions Na^+ nous avons noté une sensibilité croissante à la privation de l'ion Na^+ du tissu myocardique de l'embryon de poulet au cours du développement. Cette observation et les données bibliographiques suggèrent l'intervention éventuelle d'une autre espèce ionique vraisemblablement calcique dans la phase ascendante des P.A. ventriculaires dans les stades précoces du développement cardiaque. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris l'étude des variations de la concentration calcique des milieux de perfusion en nous limitant aux solutions hypocalciques.

I. - Effets des milieux hypocalciques sur l'activité électrique ventriculaire du coeur in situ.

Nous avons utilisé des milieux contenant le 10ème de la concentration calcique normale (solution Ty-Ca/10) et des solutions de perfusion dépourvues d'ions Ca^{2+} (solution Ty-Ca0). Compte tenu de la faible concentration en CaCl_2 de la solution normale (1,8 mM/l), le remplacement par du chlorure de choline n'est pas nécessaire.

1 - Modifications de l'activité électrique du ventricule du coeur de l'embryon de 2 jours d'incubation.

Les modifications de l'activité électrique cellulaire du tissu ventriculaire de l'embryon de 2 jours sous l'influence de la solution de perfusion Ty-Ca/10 apparaissent rapidement. Dès la première minute de perfusion par ce liquide, on observe une augmentation de la durée du P.A. par allongement du plateau, ce qui persiste tout au long de l'action. Après 3 à 4 minutes en présence de cette solution, la vitesse et l'amplitude de la phase ascendante diminuent progressivement (Fig. 44 A). L'activité

électrique est maintenue sous cette forme modifiée pendant plus d'une heure: la vitesse de la phase ascendante du P.A. est alors très lente (3,9 V/s) et l'amplitude du P.A. est de 40 à 50 mV. Une pente de dépolarisation diastolique apparaît après 10 à 15 minutes d'action de la solution hypocalcique.

En présence d'une solution de perfusion Ty-Ca0 les modifications sont semblables à celles observées en solution Ty-Ca/10, mais sont d'apparition plus précoce. Le ralentissement de la vitesse de la phase ascendante se manifeste dès la première minute de perfusion et intéresse tout d'abord la partie terminale de cette phase, puis l'ensemble de la phase ascendante. On observe une augmentation fugace de la durée du P.A., à laquelle fait suite une diminution progressive qui aboutit à un P.A. d'une durée d'environ 180 ms. L'amplitude du P.A. diminue progressivement et l'activité électrique cesse après 10 minutes environ. Dans tous les cas, il apparaît avant l'arrêt de l'activité une pente de dépolarisation diastolique. La figure 44 B rend compte des modifications observées.

Le retour au milieu de perfusion normal permet la restauration de l'activité électrique normale.

2 - Modifications de l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire à 3 jours d'incubation.

A ce stade du développement, les milieux hypocalciques produisent les modifications déjà signalées sur le coeur de l'embryon de 2 jours. Toutefois, le ralentissement de la vitesse de la phase ascendante n'apparaît que tardivement (après 15 minutes pour une solution Ty-Ca/10 et 5 minutes en milieu Ty-Ca0. L'amplitude du P.A. diminue également tardivement. En milieu Ty-Ca/10 l'activité est maintenue en général pendant 30 minutes, alors qu'en milieu Ty-Ca0 elle ne persiste que 10 minutes environ. Tant en milieu Ty-Ca/10 qu'en milieu Ty-Ca0 une pente de dépolarisation est induite. La Figure 44 C illustre les changements du décours de l'activité électrique cardiaque produits à ce stade du développement embryonnaire, par les milieux hypocalciques.

Ces observations suggèrent que l'importance de la participation calcique à la phase ascendante du P.A. est différente à ces deux stades du développement cardiaque. A 2 jours d'incubation l'ensemble de la phase ascendante est rapidement ralentie par la privation calcique, alors qu'au 3ème jour cette phase n'est modifiée que tardivement. Bien que les modifications de l'activité électrique soient d'apparition plus tardives dans le cas du coeur du stade 3 jours que dans celui du stade 2 jours, l'arrêt de l'activité est à l'inverse observé plus rapidement à 3 jours qu'à 2 jours.

3 - Modifications de l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire au stade de 4 jours d'incubation.

Quelle que soit l'importance de la réduction de la concentration en ions Ca^{2+} du milieu de perfusion, l'activité électrique est maintenue d'une manière très durable (plus de 60 minutes). On observe l'apparition d'une pente de dépolarisation lente diastolique après 20 à 30 minutes de perfusion. Après 1 heure de perfusion, l'amplitude du P.A. est de 40 à 50 mV, soit environ 50 % de la valeur normale.

Dès la première minute de perfusion, la durée du P.A. augmente. Cette augmentation de durée se maintient pendant environ 15 minutes en milieu Ty-Ca/10, alors qu'elle est fugace (4 minutes environ) en milieu Ty-Ca0. Dans les deux cas, à cette augmentation fait suite une réduction progressive de la durée du P.A. jusqu'à une valeur qui, après 30 à 40 minutes, n'évolue plus, mais se stabilise à 150 à 180 ms (Fig. 45 A).

La vitesse de la phase ascendante du P.A. n'est pas affectée par ces milieux hypocalciques au moins au niveau de sa partie initiale. Après 50 à 60 minutes de perfusion, la partie terminale de cette phase peut être ralentie, mais ceci ne s'observe pas toujours (Fig. 45 B). Ces résultats suggèrent qu'au stade considéré la participation de la perméabilité calcique est limitée à la fin de la phase ascendante et au tout début de la phase lente de repolarisation.

4 - Modifications de l'activité électrique des lambeaux ventriculaires de coeurs embryonnaires âgés (19 jours).

L'expérimentation a porté sur des lambeaux ventriculaires de coeurs d'embryons de 19 jours d'incubation, entraînés électriquement à la fréquence de 30 chocs par minute.

Tant en milieu Ty-Ca0 que dans la solution de perfusion Ty-Ca/10 le tissu myocardique conserve une activité électrique pendant un temps très long. A ce stade du développement, la sensibilité à la privation calcique semble faible. La phase ascendante du P.A. n'est modifiée qu'après un long temps de perfusion et lorsqu' une évolution se manifeste elle n'intéresse que la partie terminale. Pendant les premières minutes de la perfusion par la solution hypocalcique la durée du P.A. augmente faiblement de façon éphémère, puis diminue progressivement et, après 1 heure environ, se stabilise à des valeurs comprises entre 140 et 160 ms. L'amplitude du P.A. diminue progressivement lors de la perfusion hypocalcique et après 1 heure environ se stabilise à une valeur de 50 à 60 mV. Cette activité électrique composé de P.A. de durée et d'amplitude réduites peut persister pendant plusieurs heures. La figure 45 C illustre l'évolution de l'activité électrique cellulaire dans un milieu hypocalcique à ce stade du développement. Il est à remarquer que la perfusion par un milieu hypocalcique induit dans tous les cas l'apparition d'un foyer d'automatisme dans cette préparation créant une activité spontanée qui permet la suppression de l'entraînement électrique.

L'évolution de sensibilité aux ions Ca^{2+} du milieu de perfusion, mentionnée dans le cas du tissu ventriculaire du coeur embryonnaire de 4 jours, se poursuit donc au cours du développement puisque au 19ème jour la suppression des ions Ca^{2+} n'entraîne pas l'arrêt de l'activité électrique.

II. - Effets des milieux hypocalciques sur l'activité électrique du tissu myocardique en culture in vitro.

Les expériences ont été réalisées d'une part sur des fragments ventriculaires de coeur embryonnaire de 4 jours placés depuis plusieurs jours en culture in vitro et d'autre part sur du tissu myocardique différencié en culture in vitro à partir du mésoderme isolé de l'aire précardiaque.

1 - Action des milieux hypocalciques sur l'activité électrique des fragments ventriculaires en culture in vitro.

Quel que soit le temps de culture (4 j. ou 8 j.) les modifications de l'activité électrique sont les mêmes et sont comparables à celles qui ont été décrites dans le

cas du ventricule du coeur embryonnaire de 4 jours. Les solutions de perfusion Ty-Ca0 permettent le maintien de l'activité électrique pendant 45 minutes environ. La réduction de la concentration externe en ions Ca^{2+} (Ty-Ca/10) permet une persistance de l'activité spontanée supérieure à 1 heure. Après une augmentation transitoire de la durée du P.A. , celle-ci diminue au cours du temps de perfusion en milieu hypocalcique. La vitesse de la phase ascendante est peu modifiée, sauf dans sa partie terminale après 30 ou 40 minutes de perfusion. L'amplitude du P.A. diminue progressivement et après 15 minutes atteint 50 mV (Fig. 46 A). C'est sous cette forme modifiée en amplitude et en durée que l'activité persiste en milieu appauvri en ions Ca^{2+} (Ty-Ca/10). En milieu Ty-Ca0 l'amplitude continue à décroître jusqu'à la suppression de l'activité. La pente de dépolarisation qui existe toujours dans ces préparations où l'automatisme est généralisé, est augmentée par la réduction de la concentration externe en ions Ca^{2+} .

Ces résultats montrent que dans le cas de la culture en milieu liquide de fragments ventriculaires d'embryon de 4 jours, la sensibilité aux milieux hypocalciques est la même que pour le myocarde ventriculaire in situ, malgré les conditions artificielles réalisées par la culture in vitro et la généralisation de l'automatisme qui se produit alors.

2 - Modifications de l'activité électrique du tissu myocardique différencié en culture in vitro à partir du mésoderme précardiaque.

Les modifications de l'activité électrique apparaissent rapidement sur ce matériel. Le milieu Ty-Ca/10 ne permet un maintien de l'activité électrique spontanée que pendant 6 à 8 minutes au plus. Pendant ce temps, la durée du P.A. est légèrement augmentée; l'amplitude diminue progressivement et la vitesse de la phase ascendante est ralentie. Cette diminution de vitesse s'observe tout d'abord à la partie terminale de la phase ascendante puis, juste avant la suppression de l'activité électrique, affecte l'ensemble de cette phase (Fig. 46 B). La pente de dépolarisation qui est normalement présente à tous les niveaux de l'explant après 5 ou 6 jours de culture, est notablement augmentée. Selon les régions explorées cette augmentation varie de 12 à 35 %.

En milieu Ty-Ca0, la cessation de l'activité électrique intervient rapidement (en 2 ou 3 minutes) avant même que les modifications du P.A. précédemment décrites pour le milieu Ty-Ca/10 ne soient observées nettement, comme en témoignent les figures 46 C et D.

Il semble donc que la participation calcique dans la genèse du P.A. des cellules myocardiques différenciées en culture in vitro soit très importante puisque la réduction de la concentration de ces ions dans le milieu externe supprime rapidement l'activité électrique.

III. - Conclusions.

Nous avons vu précédemment par l'étude des effets des milieux hyposodiques quelle était la part qui revenait au sodium dans la genèse du P.A. ventriculaire de l'embryon de poulet à divers stades du développement cardiaque. Rappelons qu'au cours de la différenciation cardiaque la sensibilité à la privation des ions Na^+ augmente. Au contraire, la sensibilité à la privation calcique diminue parallèlement. Il apparaît donc qu'au cours du développement embryonnaire un changement important des propriétés membranaires cardiaques se produit. En effet, le coeur de l'embryon de 2 jours perfusé par un milieu de concentration sodique externe très réduite (Ty-Na/10) présente une activité spontanée qui persiste pendant 30 minutes environ. Dans un milieu hypocalcique (Ty-Ca/10) cette activité est maintenue pendant 1 heure et supprimée en 10 minutes par le milieu Ty-Ca0. Dès ce stade, si la participation sodique à l'activité électrique est importante, la présence des ions Ca^{2+} apparaît nécessaire.

Cette nécessité des ions Ca^{2+} aux stades précoces du développement pour l'électrogenèse du P.A. cardiaque ventriculaire et pour le maintien de l'activité électrique s'atténue progressivement au cours du développement, alors que s'affirme progressivement l'importance des ions Na^+ . Ainsi le myocarde ventriculaire de l'embryon de 4 jours perfusé par un milieu Ty-Ca0 présente une activité électrique pendant plus de 1 heure, alors que la privation sodique entraîne la suppression en 5 minutes environ. Les résultats que nous obtenons en ce qui concerne les jeunes stades du développement cardiaque (au 2ème jour de l'incubation) sont différents de ceux de

BERNARD et coll. (1968, 1969, 1970) sur le coeur embryonnaire de rat au 10ème jour de la gestation. Pour ces auteurs "la membrane à ce stade se comporte pratiquement comme une électrode au calcium lors de la dépolarisation et la part qui revient au sodium est très faible". Au 2ème jour de l'incubation chez le poulet (stade de 20 à 28 somites), la membrane myocardique ventriculaire se comporte différemment.

La diminution de l'amplitude des P.A. en milieux hypocalciques est un phénomène classique (HODGKIN, 1951; WEIDMANN, 1955a; GUILBAULT, 1966). On sait que la quantité de transports d'ions sodium disponibles est en partie sous la dépendance de la concentration extracellulaire en ions Ca^{2+} . En milieu hypocalcique, la perméabilité aux ions Na^+ est plus faible qu'en milieu normal. Cette diminution de P Na^+ en milieu hypocalcique peut expliquer en partie du moins, la réduction de l'amplitude du P.A. Le raccourcissement des réponses peut s'interpréter comme étant dû à une action des milieux hypocalciques sur la perméabilité aux ions K^+ qui serait augmentée dans de tels milieux.

L'apparition et la généralisation en culture in vitro de l'automatisme dans le tissu myocardique ventriculaire qui dans les conditions normales en est dépourvu, n'affecte pas le comportement de ce tissu vis-à-vis du calcium. Les fragments ventriculaires du coeur de l'embryon de 4 jours placés en culture in vitro en milieu liquide présentent une sensibilité aux milieux hypocalciques comparable à celle du ventricule du coeur embryonnaire de 4 jours in situ. Par contre, le tissu myocardique différencié en culture in vitro à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque est très sensible aux diminutions de la concentration calcique du milieu extérieur puisque l'activité spontanée ne peut être maintenue au-delà de 8 minutes lorsque la concentration calcique externe est réduite ($\text{Ty-Ca}/10$) et seulement pendant 3 minutes par les solutions $\text{Ty-Ca}0$. Les myoblastes cardiaques différenciés en culture in vitro présentent une sensibilité plus grande à l'égard des ions Ca^{2+} du milieu extérieur que ceux des coeurs des embryons in situ aux stades jeunes (2 jours d'incubation). Bien que l'absence d'ions Na^+ du milieu de perfusion ne permette un maintien de l'activité spontanée que durant 10 minutes environ, il apparaît que les ions Ca^{2+} soient indispensables à la genèse du P.A. de ces cellules.

Cette différence de sensibilité aux ions Ca^{2+} entre le tissu myocardique d'embryons de 4 jours cultivé in vitro et le tissu myocardique différencié in vitro met en évidence l'état peu évolué de différenciation des membranes cardiaques dans ce dernier cas. Ces deux tissus, qui présentent en commun l'existence de P.A. de type ventriculaire automatique, montrent des perméabilités ioniques membranaires différentes. Celles-ci n'étant pas modifiées au cours de la culture, on peut considérer qu'à une différenciation membranaire peu évoluée correspond une perméabilité calcique importante qui est alors nécessaire à l'électrogenèse cellulaire cardiaque.

C. EFFETS DES MILIEUX HYPOPOTASSIQUES SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE CARDIAQUE EMBRYONNAIRE.

On admet que le potentiel membranaire de repos (P.M.R.) des cellules myocardiques peut être considéré comme une pile de concentration aux ions K^+ , la membrane cellulaire se comportant comme une électrode au K^+ . Les effets des ions K^+ sur le tissu cardiaque sont bien connus. BURGÉN et TERROUX (1953) ont étudié l'action des variations de la concentration potassique externe sur l'oreillette isolée de chat et ont montré l'existence d'une relation à peu près linéaire entre le P.M.R. et la concentration extracellulaire en potassium au moins pour les concentrations élevées de cet ion. Un résultat analogue a été observé dans le cas de la fibre ventriculaire de rat adulte par MONNEREAU-SOUSTRE (1970). Selon WEIDMAN (1956 a), les milieux hypopotassiques exercent sur le tissu de Purkinje une dépolarisation importante telle que le P.M.R. en milieu sans potassium n'est plus que de 50 mV environ. TODA (1969) dans le cas des fibres sino-atriales de lapin obtient un résultat comparable. Ces auteurs, ainsi que LEPESCHKIN, SURAWICZ, HERRLICH et HOFFMAN (1957) indiquent que les milieux hypopotassiques augmentent la durée du P.A. CORABOEUF, GUILBAULT, BRETON et DUMONT (1961) étendent cette observation de l'action des milieux hypopotassiques aux coeurs isolés de rat et de cobaye adultes. La durée des P.A. est augmentée dans les deux cas, mais davantage chez le rat que chez le cobaye, alors que les effets inotropes positifs exercés sur la contraction ventriculaire sont plus marqués chez le cobaye que chez le rat. GETTES, SURAWICZ et SHIUE (1962) montrent que

les ions K^+ , outre leurs actions sur la durée du P.A. et sur le P.M.R., ont un effet sur la phase ascendante du P.A. Ainsi, les milieux hypopotassiques accélèrent cette phase, alors que les milieux enrichis en ions K^+ la diminuent. Mais cette observation ne semble pas pouvoir être généralisée à tous les tissus cardiaques. BARDY et TAN (1966) montrent que l'oreillette de grenouille soumise à des milieux sans potassium présente des P.A. très durables par allongement du plateau et qu'au cours des premières minutes d'action de cette solution de perfusion, le P.M.R. est augmenté. ROUGIER (1968) montre que dans l'oreillette de grenouille certaines fibres sont hyperpolarisées, d'autres au contraire sont dépolarisées par les milieux appauvris en K^+ . Cet auteur pense que les préparations hyperpolarisées auraient un comportement "sinusal" à l'égard des milieux hypopotassiques, alors que les préparations dépolarisées seraient plus proches du type "auriculaire" ou "ventriculaire". Selon cette nomenclature, BERNARD (1970) montre que le myocarde ventriculaire de l'embryon de rat de 13 jours aurait un comportement de type "sinusal", alors qu'à 21 jours il serait plus proche du type "auriculaire" ou "ventriculaire".

Récemment, SPERELAKIS et SHIGENOBU (1972) ont étudié l'action des milieux hyperpotassiques sur le coeur embryonnaire de poulet au 3ème jour, 5ème jour et 15ème jour de l'incubation (Fig. 47). La pente des courbes représentant la valeur du P.M.R. en fonction de $[K^+]_e$ varie avec le stade du développement cardiaque. Les coeurs d'embryons de 3 et 5 jours sont moins dépolarisés dans les solutions hyperpotassiques que des coeurs d'embryons de 15 jours. PAPPANO (1972a) trouve un résultat analogue dans le cas des cellules atriales du coeur embryonnaire de poulet de 4 et 6 jours d'incubation.

Les résultats obtenus par BERNARD (1970 a) par l'étude de l'action des milieux hypopotassiques sur le coeur embryonnaire de rat et par SPERELAKIS et SHIGENOBU (1972) par l'étude de l'action des milieux hyperpotassiques sur le coeur embryonnaire de poulet, nous ont incité à comparer les effets produits par les milieux de perfusion appauvris ou privés d'ions K^+ sur le myocarde ventriculaire de l'embryon de poulet à divers stades de son développement d'une part et sur le tissu myocardique différencié dans les conditions de la culture in vitro à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque d'autre part.

I. - Effets des milieux hypopotassiques sur l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire in situ.

Nous avons étudié l'action de deux solutions hypopotassiques: des solutions de perfusion Ty-K/10 et Ty-K0. Dans les deux cas la très légère diminution de l'osmolarité de la solution n'est pas compensée.

1 - Action des milieux hypopotassiques sur l'activité électrique du ventricule du coeur embryonnaire au 2ème jour de l'incubation.

Les solutions Ty-K/10 ou Ty-K0 produisent toutes les deux les mêmes modifications de l'activité électrique. Toutefois les effets sont d'apparition plus précoce dans le cas des solutions Ty-K0.

Dès la deuxième minute de perfusion par la solution hypopotassique, l'amplitude et la durée du P.A. augmentent. Cette augmentation de l'amplitude du P.A. d'environ 5 à 10mV ne semble pas liée à une hyperpolarisation diastolique, mais la difficulté des pénétrations intracellulaires par la microélectrode ne nous permet pas d'être tout à fait affirmatif sur ce point. Progressivement, au cours du temps d'action, la vitesse de la phase lente de repolarisation (plateau) augmente et après 10 minutes environ, l'ensemble de la repolarisation du P.A. s'effectue à vitesse constante. Simultanément, le P.M.R. diminue et cette dépolarisation entraîne une réduction de l'amplitude du P.A., alors qu'une faible pente de dépolarisation diastolique apparaît. L'amplitude du P.A. continue à diminuer et atteint après 20 minutes une valeur de 30 à 40 mV. L'activité électrique persiste pendant 45 minutes dans une solution Ty-K/10 et n'excède pas 30 minutes en milieu Ty-K0. A la suppression de l'activité spontanée le P.M.R. n'est plus que de 20 à 25 mV. La figure 48 A illustre l'ensemble des modifications observées.

2 - Action des milieux hypopotassiques sur l'activité électrique ventriculaire du coeur de l'embryon de 3 jours.

Quelle que soit la réduction de la concentration du milieu de perfusion en ions K^+ , les modifications immédiates de l'activité électrique sont identiques. Cependant les délais d'apparition des effets sont en rapport avec l'importance de la diminution de la concentration potassique externe.

Dès la deuxième minute de perfusion, l'amplitude et la durée du P.A. augmentent. Après 16 à 30 minutes, selon la teneur en ions K^+ de la solution, l'amplitude du P.A. diminue. Cette réduction d'amplitude est associée à une diminution de la valeur du P.M.R. qui se stabilise à 30 ou 35 mV environ. Comme au stade précédent, la vitesse de la première phase de repolarisation est accélérée et la membrane se repolarise à vitesse constante. Une dépolarisation lente diastolique apparaît (Fig. 48 B). L'activité électrique est maintenue très longtemps. En milieu Ty-K/10, après 60 minutes environ de perfusion, l'activité électrique apparaît par salves. A des P.A. d'amplitude normalement réduite par ce milieu, fait suite une succession de P.A. d'amplitude de plus en plus réduite, puis l'activité cesse pendant 1 seconde environ. Des ondulations du potentiel de membrane progressivement de plus en plus amples aboutissent à la reprise de l'activité électrique (Fig. 48 C). Dans les milieux Ty-K0 cette activité électrique par salve n'apparaît pas; l'activité électrique, d'amplitude réduite par diminution du P.M.R., est arythmique dès la 20ème minute d'action environ, mais se maintient pendant plus d'une heure.

3 - Modifications de l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire de 4 jours.

Les modifications du décours des P.A. sont d'apparition tardive en milieu Ty-K/10. Après 30 minutes de perfusion par ce milieu, le P.A. ne présente aucune modification. Les premiers changements apparaissent après 45 minutes de perfusion. Après une fugace augmentation de la durée du P.A. par allongement de la première phase de repolarisation, la durée diminue. La repolarisation ne présente plus les deux phases normales et s'effectue à vitesse constante. L'amplitude du P.A. diminue, mais le P.M.R. reste stable; même après un long séjour dans la solution de perfusion Ty-K/10 le P.M.R. se maintient à une valeur d'environ 50 mV. L'activité électrique persiste sans apparition d'une pente de dépolarisation diastolique.

En milieu Ty-K0 la durée du P.A. augmente au cours des premières minutes d'action par allongement du plateau portant sur la phase initiale de repolarisation. L'amplitude du P.A. augmente de 10 à 15 mV après 5 minutes, puis diminue. Progressivement la vitesse de repolarisation devient constante. On ne distingue plus les deux pha-

ses habituelles de repolarisation. Le P.M.R. est réduit de 10 à 15 mV. L'activité électrique est maintenue sous cet aspect. Il n'apparaît jamais de pente de dépolarisation diastolique, même après une heure et demie de perfusion par le milieu Ty-K0. Par contre l'apparition d'une arythmie est fréquente. La figure 49 A montre quelques aspects de ces modifications de l'activité électrique.

Dès ce stade du développement embryonnaire, il apparaît que le P.M.R. est peu sensible à la privation potassique. L'absence de pente de dépolarisation lente diastolique en milieu hypopotassique montre la stabilité de la perméabilité potassique membranaire de repos à ce stade, alors qu'aux stades plus précoces du développement une modification de la concentration ionique en ions K^+ produit des perturbations importantes de l'activité électrique. On peut penser, à cet égard, que le niveau d'activation du courant potassique est plus élevé à ce stade du développement qu'aux stades antérieurs.

4 - Modifications de l'activité électrique du lambeau ventriculaire du coeur embryonnaire de 19 jours.

Cette étude a été faite sur des lambeaux entraînés par des chocs électriques (30 chocs par minute). Les effets des milieux hypopotassiques sur l'activité électrique de ce tissu ne se manifestent qu'après un très long temps de perfusion (30 à 45 minutes). L'amplitude des P.A. augmente alors de 10 mV environ, puis diminue. La durée du P.A. est diminuée lorsque la vitesse de la repolarisation lente (plateau) est augmentée. Après 60 minutes de perfusion, les phases rapide et lente de repolarisation ne se distinguent plus l'une de l'autre et la membrane est repolarisée à vitesse constante (Fig. 49 B). La diastole reste isopotentielle et l'activité électrique est maintenue pendant plus d'une heure et demie par les solutions Ty-K0 et n'est jamais supprimée par les solutions Ty-K/10.

Il apparaît qu'au cours du développement embryonnaire, la sensibilité à la privation des ions K^+ extracellulaires diminue. Aux 2ème et 3ème jours de l'incubation, les milieux hypopotassiques en créant une pente de dépolarisation lente diastolique sou-

lignent un "équilibre" critique du P.M.R. qui, aux stades plus avancés du développement est stable.

L'évolution au cours de la différenciation cardiaque des effets des milieux hypopotassiques sur le P.M.R. nous a incité à étudier de façon comparative les actions exercées par de tels milieux dans le cas du tissu myocardique en culture in vitro.

II. - Effets des milieux hypopotassiques sur l'activité électrique du tissu myocardique cultivé in vitro.

Les expériences ont été réalisées sur des fragments ventriculaires du coeur embryonnaire de 4 jours placés en culture en milieu liquide pendant plusieurs jours et d'autre part sur du tissu myocardique différencié en culture in vitro dans le milieu de RINALDINI à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque présomptive.

1 - Activité électrique de fragments myocardiques ventriculaires d'embryon de 4 jours dans les milieux hypopotassiques.

Après 7 jours de culture, les explants placés dans un milieu Ty-K/10 présentent un décours du P.A. qui est modifié. La durée du P.A. augmente dès les premières minutes de perfusion, par allongement du plateau. L'amplitude du P.A., après une éphémère augmentation, diminue. Ceci semble pouvoir être rapporté à une réduction de la valeur du P.M.R. de 10 à 20 mV selon les cas. Après 20 minutes de perfusion à des P.A. d'amplitude d'environ 60 à 80 mV font suite des P.A. d'amplitude réduite et des ondulations du P.M.R. sans activité propagée. Ces ondulations augmentent progressivement d'amplitude et aboutissent à une activité électrique propagée qui présente le décours modifié par les milieux hypopotassiques précédemment décrit. La pente de dépolarisation lente diastolique est augmentée par ces milieux. L'augmentation de cette pente varie selon la région de l'explant explorée et en fonction du temps de perfusion. La vitesse de la dépolarisation diastolique s'accroît de 17 à 38 % selon les cas. La figure 50 A illustre ces modifications.

Dans les milieux Ty-K0, l'amplitude et la durée du P.A. ne sont pas d'emblée modifiées, tandis que la pente de dépolarisation diastolique est augmentée. Après 4 à 5 minutes de perfusion, l'arrêt de l'activité électrique intervient brutalement sans que

l'on ait observé de modifications notables du décours du P.A. Toutefois le P.M.R. diminue progressivement (Fig. 50 B) mais faiblement (5 mV environ), ainsi que l'amplitude et le rythme d'apparition des P.A.

Les résultats obtenus sur ces préparations montrent à l'égard des milieux hypopotassiques un comportement nettement différent de celui du ventricule embryonnaire de 4 jours in situ. L'apparition d'un automatisme qui se généralise à l'ensemble de l'explant est en relation avec une sensibilité accrue du tissu aux milieux hypopotassiques et les modifications de l'activité électrique au niveau du P.M.R. sont alors proches de celles qui sont observées sur les coeurs d'embryons de 2 et 3 jours d'incubation.

2 - Modifications de l'activité électrique du tissu myocardique différencié en culture in vitro.

Le tissu myocardique différencié à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque a été cultivé pendant 7 jours, puis soumis à l'action de milieux hypopotassiques. Les modifications de l'activité électrique par les milieux hypopotassiques sont proches de celles observées dans le cas des fragments ventriculaires du coeur de 4 jours et cultivés in vitro. Si l'amplitude et la durée du P.A. ne sont pas modifiées même par les solutions Ty-K0 la vitesse de la pente de dépolarisation lente diastolique est accélérée. Après 8 à 10 minutes de perfusion par un tel milieu, la vitesse de la phase ascendante diminue et l'amplitude du P.A. est réduite de 15 à 20 mV (Fig. 50 C). La repolarisation membranaire se fait à vitesse constante sans modifier la durée du P.A. Le P.M.R. diminue de 15 à 20 mV après 15 minutes et l'activité spontanée cesse. En milieu Ty-K/10 ces modifications apparaissent plus tardivement et l'arrêt n'est obtenu qu'après 40 minutes de perfusion.

III. - Conclusions.

La théorie ionique du potentiel de repos prévoit une augmentation du P.M.R. lorsque la concentration externe en ions K^+ diminue. Dans le cas du coeur embryonnaire de poulet, les milieux hypopotassiques produisent une dépolarisation de la membrane

plus ou moins accentuée selon le stade du développement. Une dépolarisation membranaire en milieu hypopotassique dans le cas des fibres de Purkinje de mouton et de veau a été observée par WEIDMANN (1956 a) et par BORGHGRAEF et CARMELIET (1957) sur l'oreillette de grenouille. ROUGIER (1968) distingue deux types de variations dans la polarisation membranaire sous l'effet des ions K^+ sur les trabécules de l'oreillette de grenouille. Certaines sont dépolarisées, d'autres hyperpolarisées par les milieux appauvris en ions K^+ . BERNARD (1970 a) observe une dépolarisation membranaire de 5 à 10 mV des myoblastes ventriculaires de l'embryon de rat de 13 jours sous l'influence des milieux hypopotassiques.

Les résultats obtenus montrent que la sensibilité à la concentration potassique externe diminue au cours du développement embryonnaire. Alors que les modifications et la suppression de l'activité spontanée en milieu hypopotassique sont tardives à se manifester sur des coeurs d'embryons de 4 jours, elles apparaissent précocement sur les coeurs embryonnaires de 2 et 3 jours. Sur des cultures de cellules cardiaques isolées provenant de coeurs embryonnaires de poulet du 2ème au 7ème jour de l'incubation, DE HAAN (1967, 1970) a mis en évidence une augmentation avec l'âge de l'embryon donneur de l'insensibilité à l'égard de la concentration externe en ions K^+ . Pour cet auteur il existerait un rapport entre la sensibilité des cellules aux ions K^+ et la perméabilité membranaire pour ces ions (P_{K^+}). Ainsi P_{K^+} serait faible aux jeunes stades du développement. Cette hypothèse peut être envisagée compte-tenu de l'évolution des valeurs des résistances membranaires des myoblastes cardiaques du poulet au cours du développement. En effet, du 2ème au 8ème jour d'incubation, la résistance membranaire diminue et se stabilise à partir du 8ème jour de l'incubation à la valeur trouvée chez l'adulte (4,5 M Ω environ). Au 2ème jour de l'incubation la valeur de la résistance membranaire est de 14 M Ω environ, à 3 jours de 9 M Ω , à 4 jours de 6,5 M Ω , puis de 5 M Ω à 5 jours (SPERELAKIS et SHIGENOBU, 1972). Si la capacité membranaire n'évolue pas notablement au cours de ce temps, la résistance membranaire diminue et P_{K^+} augmente. L'augmentation de la valeur de l'amplitude du P.A. au cours du développement peut être interprétée sur cette base. On peut signaler ici qu'une évolution de P_{K^+} a été observée dans d'autres systèmes embryonnaires que le coeur. Ainsi, TUPPER et POWERS (1972) ont montré que la P_{K^+} de blastomères

d'étoile de mer augmentait d'un facteur 4 lors du développement embryonnaire, alors que P_{Na}^+ reste constante. Dans le cas du coeur embryonnaire la diminution du rapport P_{Na}^+/P_{K}^+ peut rendre compte de l'augmentation du P.M.R. D'autre part, l'augmentation du P.M.R. au cours du développement permet une activation de plus en plus grande du système transporteur sodique responsable de la phase ascendante du P.A. L'accroissement de la perméabilité potassique au cours de la différenciation aboutirait à accroître l'amplitude du P.A. en augmentant le P.M.R. et en permettant ainsi une activation plus importante des courants entrants.

Aux stades de 2 et 3 jours d'incubation, l'apparition et l'augmentation de la pente de dépolarisation diastolique par les milieux hypopotassiques met en évidence l'instabilité du P.M.R., alors qu'au 4ème jour du développement la diminution de la concentration potassique externe n'induit pas de pente de dépolarisation lente.

L'augmentation de la durée du P.A. en milieu hypopotassique peut s'interpréter sur la base des observations de CARMELIET (1960). Le potassium perméabilisant la membrane à lui-même, l'allongement des P.A. serait due à la diminution de la perméabilité aux ions K^+ dans les milieux hypopotassiques.

Nos résultats montrent, dans le cas des coeurs embryonnaires de poulet aux stades précoces du développement (2 et 3 jours) et sur le tissu myocardique en culture in vitro, le développement et l'augmentation de la pente de dépolarisation lente diastolique par les solutions hypopotassiques. WEIDMANN (1951), DUDEL et TRAUTWEIN (1958) par des mesures de résistance membranaire ont montré que la somme des conductances ioniques diminuait au cours de cette phase qui serait due à une baisse de g_{K}^+ plutôt qu'à une augmentation de g_{Na}^+ . Les milieux hypopotassiques en diminuant g_{K}^+ favoriseraient l'apparition de l'automatisme en développant la composante $g_{K_1}^+$ de la conductance potassique selon NOBLE et TSIEN (1969 a) et en créant une conductance sodique lente. Cette initiation de l'automatisme en milieux hypopotassiques a été observée par OLIVEIRA CASTRO et PAES DE CARVALHO (1970) sur des cultures de myoblastes ventriculaires isolés d'embryon de poulet.

La culture in vitro du tissu myocardique ventriculaire d'embryons de 4 jours modifie certaines des propriétés membranaires des myoblastes. Alors que les milieux

hypopotassiques ne modifient pas notablement le P.M.R. des cellules ventriculaires du coeur embryonnaire de 4 jours et que l'activité électrique persiste très longtemps, les fragments ventriculaires de coeurs de même âge en culture in vitro montrent une grande sensibilité à la privation potassique se traduisant par des ondulations du potentiel de membrane ou par la cessation de l'activité électrique. Il semble que les conditions imposées par la culture (qui se traduisent par l'apparition d'un automatisme) font réapparaître une perméabilité de repos rappelant les stades très précoces du développement. Dans le cas du tissu myocardique différencié en culture in vitro, un comportement analogue est observé et les modifications de l'activité électrique sous l'influence des milieux hypopotassiques soulignent à nouveau le caractère archaïque des perméabilités ioniques membranaires de ce tissu. Le ralentissement de la phase ascendante du P.A. par ces milieux n'est pas en accord avec l'observation de WEIDMANN (1956 b) réalisée sur le coeur refroidi de tortue. Selon cet auteur, les ions K^+ en excès agiraient en accélérant le fonctionnement de la "pompe à sodium". GETTES, SURAWICZ et SHIUE (1962) montrent que les milieux hypopotassiques accélèrent la vitesse de la phase ascendante des P.A. du coeur de lapin. BERNARD (1970 a) observe en même temps qu'une diminution du P.M.R. un ralentissement de la phase ascendante du P.A. des cellules ventriculaires de l'embryon de rat de 13 jours sous l'influence des milieux hypopotassiques. Dans de tels milieux la diminution de la vitesse de la phase ascendante des P.A. des cardiomyoblastes différenciés en culture in vitro peut être due à la dépolarisation du P.M.R. Le seuil d'activation du système transporteur sodique rapide ne serait pas atteint et la dépolarisation résulterait d'un courant ionique de cinétique lente. La sensibilité vis-à-vis des ions Ca^{2+} et les perméabilités ioniques membranaires peu évoluées du tissu myocardique différencié in vitro permettent d'envisager l'existence d'une perméabilité de cinétique lente intervenant dans la genèse du P.A. de cette préparation.

Les modifications de l'activité électrique cellulaire produites par les variations des concentrations ioniques externes nous conduisent à entreprendre à l'aide d'inhibiteurs des perméabilités membranaires une étude plus précise des perméabilités ioniques qui interviennent au cours du P.A. pendant la différenciation cardiaque de l'embryon de poulet.

Quatrième partie :

=====

ETUDE, PAR L'EMPLOI D'INHIBITEURS, DES PERMEABILITES
IONIQUES MEMBRANAIRES DU TISSU MYOCARDIQUE EMBRYONNAIRE
DE POULET.

A. - Effets des inhibiteurs de perméabilité ionique membranaire sur
l'activité électrique du coeur embryonnaire à divers stades de
l'ontogenèse.

I - Action des inhibiteurs sur l'activité électrique ventriculaire
du coeur embryonnaire de 2 jours.

II - Action des inhibiteurs sur l'activité électrique ventriculaire
du coeur embryonnaire de 3 jours.

III - Action des inhibiteurs sur l'activité électrique ventriculaire
du coeur embryonnaire de 4 jours.

IV - Action des inhibiteurs sur l'activité électrique ventriculaire
du coeur embryonnaire de 19 jours.

V - Conclusions.

B. - Effets des inhibiteurs de perméabilité ionique membranaire sur l'activité
électrique du tissu myocardique en culture in vitro.

I - Action des inhibiteurs de perméabilité ionique sur l'activité
électrique des fragments ventriculaires en culture.

II - Action des inhibiteurs de perméabilité ionique sur l'activité
électrique du tissu myocardique différencié en culture in vitro
à partir du mésoderme précardiaque explanté isolément.

III - Action des inhibiteurs de perméabilité ionique sur l'activité
électrique des tubes cardiaques différenciés en culture in vitro.

IV - Conclusions.

Les effets des modifications de concentrations ioniques des milieux de perfusion ont mis en évidence des changements des perméabilités membranaires au cours du développement embryonnaire. Toutefois, les résultats obtenus ne permettent pas de déterminer la cinétique des perméabilités ioniques responsables du décours du P.A. aux divers stades du développement cardiaque. La technique du voltage imposé est difficilement applicable à des tissus de configuration géométrique tridimensionnelle, ce qui est le cas du myocarde embryonnaire dont les cellules sont en outre de petite taille. L'emploi des inhibiteurs de perméabilités ioniques, dans la limite de leur spécificité, permet d'analyser la nature des conductances impliquées dans la genèse et le développement du P.A. Dans ce but, nous avons utilisé la tétródotoxine, le chlorure de tétraéthylammonium, le chlorure de manganèse et le chlorure de lanthane.

- La tétródotoxine (TTX) est un inhibiteur très spécifique dont les effets se limitent à l'inhibition exclusive du courant entrant sodique de cinétique rapide. Cette propriété de la TTX a été mise en évidence tout d'abord dans le cas de l'axone géant du homard (NARAHASHI, MOORE et SCOTT, 1964; MOORE, BLAUSTEIN, ANDERSON et NARAHASHI, 1967). Cet effet de la TTX a pu être étendu aux tissus cardiaques notamment par HAGIWARA et NAKAJIMA (1965, 1966), par ROUGIER, VASSORT, GARNIER, GARGOUÏL et CORABOEUF (1968 a, 1969) sur le coeur de grenouille, par CORABOEUF et VASSORT (1967, 1968) aux coeurs de cobaye et de rat adultes, par DUDEL, PEPPER, RÜDEL et TRAUTWEIN (1967) sur les fibres de Purkinje de mouton, par BERNARD et GARGOUÏL (1968 a, 1970 b) au coeur embryonnaire de rat, par LENFANT, MIRONNEAU, GARGOUÏL et GALAND (1968) au coeur de lapin, par SPERELAKIS et LEHMKUHL (1965), SHIGENOBU et SPERELAKIS (1971) et SPERELAKIS et SHIGENOBU (1972) aux myoblastes cardiaques embryonnaires en culture in vitro, par PAPPANO (1972 b) à l'oreillette isolée du coeur embryonnaire de poulet et par LASSALLE et GUILBAULT (1972) au coeur de crabe.

- Les ions manganèse sont considérés comme des inhibiteurs spécifiques de la perméabilité calcique (FATT et GINSBORG, 1958). Ces auteurs ont mis en

évidence cette action des ions Mn^{2+} sur des fibres musculaires de crustacé. Depuis, HAGIWARA et NAKAJIMA (1965, 1966) ont montré que le manganèse supprimait le P.A. "calcique" des fibres musculaires de balane, ainsi que la deuxième partie de la phase ascendante des P.A. ventriculaires de grenouille. CORABOEUF et VASSORT (1967, 1968) par l'emploi des ions Mn^{2+} ont montré la participation d'une perméabilité calcique au niveau du plateau des P.A. de coeurs de cobaye et de rat adultes. ROUGIER (1968) montre que les ions Mn^{2+} agissent sur le myocarde ventriculaire de grenouille, au niveau des conductances sodique et calcique de cinétique lente. Cette observation conduit à considérer que les ions Mn^{2+} sont davantage des inhibiteurs des conductances lentes que des inhibitions spécifiques de la perméabilité calcique.

- Le chlorure de tétraéthylammonium (TEA) a été longtemps considéré comme un inhibiteur spécifique de la perméabilité potassique, ainsi que l'ont montré HILLE (1966) et KOPPENHÖFER (1967) sur le noeud de Ranvier. Il semble qu'il en soit de même au niveau de la fibre musculaire squelettique (ROUGIER, VASSORT et ILDEFONSE, 1968). En ce qui concerne le tissu cardiaque, CHANG et SCHMIDT (1960) ont montré que le TEA augmentait légèrement la durée des potentiels d'action des fibres de Purkinje. De même, CORABOEUF et VASSORT (1967, 1968) montrent que le TEA allonge le P.A. cardiaque des ventricules de rat et de cobaye adultes, ce que retrouve ROUGIER (1968) sur le myocarde de grenouille. Toutefois les travaux de GARNIER et ROUGIER (1968, 1969) précisent que le TEA agit en inhibant à la fois le courant entrant lent et le courant sortant potassique. Le TEA ne serait donc pas un inhibiteur parfaitement spécifique de la rectification retardée.

- Le chlorure de lanthane (La^{3+}) est considéré comme un inhibiteur de la perméabilité calcique. LASZLO, ECKSTEIN, LEWIN et STERN (1952) à la suite de travaux utilisant des techniques d'autoradiographie ont suggéré que le lanthane administré reste localisé dans les espaces extracellulaires cardiaques et que, sous forme ionisée, il ne pénétrait pas à l'intérieur des cellules. HAGIWARA et TAKAHASHI (1967) ont montré que le lanthane présentait une affinité très supérieure à celle du manganèse pour les sites calciques. WEISS et GOODMAN (1969) montrent que le

lanthane inhibe la fixation des ions Ca^{2+} sur les membranes cellulaires de l'iléon de cobaye. Un résultat semblable est obtenu par VAN BREEMEN (1969) sur les muscles lisses de l'aorte de lapin et par GOODMAN et WEISS (1971) dans le cas de l'utérus de rat. Un travail en microscopie électrique de LANGER et FRANCK (1972) confirme les résultats autoradiographiques de WEISS et GOODMAN (1969) et montre que le lanthane en se fixant à la membrane des myoblastes de rat cultivés in vitro, supprime les échanges calciques. DUVERT (communication personnelle, 1973) en administrant du lanthane dans l'eau de mer artificielle où vivent des Sagitta montre, par des techniques histochimiques en microscopie électronique, que le lanthane est incorporé dans le sarcolemme des muscles et sur les membranes du système T. Les ions La^{3+} , d'après cet auteur, se fixeraient sur les sites anioniques membranaires.

Bien que BESSEAU, LENFANT et MIRONNEAU (1971), dans une étude comparative de l'action des ions La^{3+} sur l'activité électrique du sinus de lapin et des fibres sino-auriculaires de grenouille soient amenés à penser que le lanthane n'est pas un inhibiteur parfaitement spécifique de la perméabilité calcique, l'effet le plus évident des ions La^{3+} sur les membranes cellulaires est cependant cette inhibition.

Nous avons éprouvé l'action de ces inhibiteurs sur l'activité électrique du ventricule embryonnaire in situ à différents stades du développement cardiaque et sur le tissu myocardique différencié en culture *in vitro* en milieu liquide.

A. EFFETS DES INHIBITEURS DE PERMEABILITE IONIQUE MEMBRANAIRE SUR
=====

L'ACTIVITE ELECTRIQUE DU COEUR EMBRYONNAIRE A DIVERS STADES
=====

DE L'ONTOGENESE.
=====

L'expérimentation a été réalisée sur les stades de développement déjà retenus pour l'action des facteurs ioniques, c'est-à-dire au 2ème, 3ème, 4ème et 19ème jour du développement embryonnaire.

Les inhibiteurs sont utilisés aux concentrations de

- $5 \cdot 10^{-7}$ g/ml pour la TTX
- 5 mM/l pour le MnCl_2
- 5 mM/l pour le TEA
- 2 mM/l pour le LaCl_3 (1 mM/l dans certaines séries expérimentales).

I. - Action des inhibiteurs sur l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire de 2 jours (stades de 20 à 30 somites).

1 - Action de la TTX.

L'administration de TTX ne produit pas d'effet immédiat. Après 3 à 4 minutes d'action, la vitesse de la phase ascendante du P.A. est diminuée. Ce ralentissement s'accroît progressivement puis, après une demi-heure d'action environ, l'activité électrique ne se modifie plus et l'amplitude du P.A. se stabilise à environ 55 mV (Fig. 51 A). L'application d'un courant transmembranaire hyperpolarisant au cours des premières minutes d'action de la TTX augmente l'amplitude de la phase ascendante. Après 30 minutes de séjour en présence de l'inhibiteur la vitesse et l'amplitude de cette phase ne sont pas modifiées par les courants hyperpolarisants (Fig. 51 D). Dans aucun des cas (14 coeurs) l'activité cardiaque n'a été supprimée par la TTX, même après des séjours dépassant une heure en présence de l'inhibiteur.

2 - Action des ions Mn^{2+} .

L'activité électrique se modifie après 3 à 4 minutes en présence de cet inhibiteur. De façon très progressive la phase ascendante du P.A. est ralentie;

après 20 minutes d'action, cet effet est très accentué mais n'évolue plus. L'amplitude du P.A. et sa durée sont diminuées (Fig. 51 B); l'activité électrique cardiaque se maintient dans tous les cas (9 cas) avec une amplitude de 40 à 45 mV et une durée de 180 ms environ, malgré une administration prolongée de l'inhibiteur.

3 - Actions simultanées de la TTX et des ions Mn^{2+}

L'action conjuguée de ces deux inhibiteurs supprime rapidement l'activité électrique (Fig. 51 C). Dès l'administration simultanée de la TTX et des ions Mn^{2+} l'amplitude du P.A. et sa durée diminuent. La phase ascendante est ralentie et la suppression de l'activité électrique est obtenue après 4 à 5 minutes. Le P.M.R. dans ces conditions est réduit de 15 à 20 mV, alors que l'administration séparée de l'un ou l'autre des inhibiteurs ne produit pas de modification notable de sa valeur. Notons que les préparations retrouvent une activité électrique normale lorsqu'elles sont perfusées par un liquide sans inhibiteurs.

4 - Action du TEA.

Dès l'administration du TEA, la durée du P.A. augmente par allongement de la phase lente de repolarisation (plateau). Cette augmentation s'accroît progressivement et la durée du P.A. est doublée vers la 5ème minute d'action et triplée vers la 15ème minute. Au cours de cette augmentation de la durée, la distinction entre les deux phases de repolarisation s'atténue progressivement et 15 minutes environ après l'administration de l'inhibiteur, la repolarisation s'effectue à vitesse constante (Fig. 52 A). L'amplitude du P.A. et la vitesse de la phase ascendante ne sont affectées que tardivement. La vitesse de la phase ascendante est ralentie et l'amplitude du P.A. diminuée de 20 mV environ après 30 minutes d'action. Une pente de dépolarisation lente diastolique apparaît peu de temps après le début de l'action du TEA. L'activité électrique persiste même après des séjours en présence de TEA dépassant une heure.

Au cours de l'action du TEA nous avons observé un renforcement des systoles. Il n'a pas été possible de réaliser l'enregistrement simultané des activités

électriques et mécaniques, mais l'effet inotrope positif produit par le TEA nous paraît certain.

5 - Action du lanthane.

Cet inhibiteur conduit à une suppression rapide de l'activité électrique. Au début de la perfusion avec le milieu contenant les ions La^{3+} le rythme cardiaque est accéléré, la vitesse de la phase ascendante est réduite, l'amplitude du P.A. diminue et une pente de dépolarisation apparaît. Ces modifications s'accroissent progressivement et aboutissent après 15 secondes à 1 minute à la cessation de l'activité électrique. La figure 52 B illustre les effets du lanthane. Le P.M.R. ne semble pas modifié. Le retour à un milieu de perfusion dépourvu d'ions La^{3+} permet la récupération d'une activité électrique normale.

II. - Action des inhibiteurs sur l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire de 3 jours (32 à 40 somites).

1 - Action de la TTX.

Les altérations de l'activité électrique apparaissent rapidement et conduisent dans tous les cas (19 coeurs) à une suppression de l'activité en 5 à 10 minutes. La vitesse de la phase ascendante est ralentie dès la première minute d'action. L'amplitude et la durée du P.A. diminuent. Ces modifications s'accroissent progressivement et aboutissent à l'arrêt de l'activité (Fig. 53 A). Le P.M.R. n'est pas modifié.

Dans quelques cas (7 coeurs) la TTX provoque une dissociation de la phase ascendante en deux composantes. Cette dissociation se manifeste après ralentissement de l'ensemble de la phase ascendante (Fig. 53 B). Progressivement, au cours de l'action, l'amplitude et la vitesse de la composante initiale de la phase ascendante diminuent (Fig. 53 B) et l'arrêt de l'activité intervient plus précocement (en 5 minutes) que sur les 12 autres coeurs ne présentant pas ce phénomène. Il est à noter que cette évolution particulière de la phase ascendante du P.A. sous l'influence de la TTX a été observée sur des coeurs d'embryons aux stades de 36 à 40 somites et ne s'est pas produite en dehors de cette période du développement embryonnaire.

2 - Action des ions Mn^{2+} .

Dans une première phase d'action, les ions Mn^{2+} produisent une diminution de l'amplitude du P.A. par ralentissement de la partie terminale de la phase ascendante, tandis que la première partie n'est pas affectée (Fig. 53 C). L'activité électrique subsiste plus longtemps qu'en présence de TTX, mais est supprimée dans tous les cas (12 coeurs) après 15 à 20 minutes en présence de l'inhibiteur.

3 - Action du TEA.

Les effets obtenus sont comparables à ceux qui ont été rapportés dans le cas du ventricule embryonnaire de 2 jours. Toutefois, la diminution de l'amplitude du P.A. apparaît ici dès les premières minutes d'action. La partie finale de la phase ascendante est très ralentie. Plus tardivement, après 20 à 30 minutes d'action, la vitesse de l'ensemble de la phase ascendante est diminuée (Fig. 54 A). L'activité électrique du coeur embryonnaire de trois jours n'est pas supprimée par une perfusion de longue durée en présence de TEA (6 cas) et, à l'observation, les contractions paraissent être plus puissantes.

4 - Action du lanthane.

Sous l'action des ions La^{3+} la vitesse de la partie terminale de la phase ascendante du P.A. est immédiatement ralentie. L'amplitude du P.A. diminue. Progressivement l'ensemble de la phase ascendante est ralentie et la diminution d'amplitude du P.A. s'accroît. Sur les 7 cas étudiés, l'activité électrique cesse en 20 à 30 secondes (Fig. 54 B). A une concentration plus faible, de 1 mM/l, le lanthane produit les mêmes modifications de l'activité électrique. Celles-ci sont d'apparition plus lente et d'évolution plus progressive. L'activité électrique cesse toutefois après 10 minutes de séjour en présence de l'inhibiteur à cette faible concentration.

III. - Action des inhibiteurs sur l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire de 4 jours.

1 - Action de la TTX.

Les modifications de l'activité électrique apparaissent dès l'administration

de l'inhibiteur. La vitesse de l'ensemble de la phase ascendante est diminuée dès la première minute. Cette modification s'accroît progressivement. L'amplitude du P.A. diminue et l'arrêt de l'activité est obtenu dans tous les cas (16 coeurs) en 10 minutes environ (Fig. 55 A). Le P.M.R. n'est pas modifié. L'application d'un courant hyperpolarisant transmembranaire au cours des premières minutes d'action produit une augmentation de l'amplitude du P.A. qui ne s'observe plus après 5 à 6 minutes de séjour en présence de l'inhibiteur (Fig. 55 B).

2 - Action des ions Mn^{2+} .

La différence essentielle avec les résultats obtenus dans le cas du ventricule embryonnaire de 3 jours réside dans la persistance plus durable de l'activité électrique qui est maintenue pendant 45 minutes environ. Les modifications du déroulement du P.A. sous l'action des ions Mn^{2+} apparaissent plus tardivement qu'au stade précédent du développement (Fig. 55 C).

3 - Action du TEA.

L'allongement du plateau apparaît immédiatement et la durée du P.A. est doublée après 2 minutes de séjour en présence de l'inhibiteur. Dès la première minute d'action, la fin de la phase ascendante et le début du plateau sont légèrement déprimés et le plateau présente un rebond (Fig. 56 A). Progressivement l'amplitude du P.A. diminue et après 15 minutes la totalité de la phase ascendante est ralentie. L'activité électrique n'est jamais supprimée.

4 - Action du lanthane.

Le lanthane ne produit pas les modifications précédemment décrites. La durée du P.A. est légèrement augmentée et la vitesse de la partie terminale de la phase ascendante faiblement diminuée. Cet effet sur la durée du P.A. n'est pas durable et après 5 minutes d'action environ, la durée du P.A. est identique à celle des P.A. sans inhibiteur. Une arythmie apparaît vers la 15ème minute et l'activité persiste pendant 30 minutes environ (Fig. 56 B). L'arrêt de l'activité intervient brusquement sans qu'il n'apparaissent préalablement d'altérations plus profondes de l'activité électrique.

IV. - Action des inhibiteurs sur l'activité électrique ventriculaire du coeur embryonnaire de 19 jours.

Les lambeaux ventriculaires utilisés pour cette étude sont entraînés électriquement au rythme de 30 cycles par minute.

1 - Action de la TTX.

Dès l'administration de l'inhibiteur la vitesse de la phase ascendante du P.A. est ralentie; le P.A. est réduit en durée et en amplitude. Ces modifications apparaissent en moins d'une minute. Ces changements du décours de l'activité électrique s'accroissent progressivement au cours du temps d'action (Fig. 57 A). Le seuil d'excitabilité du tissu augmente et, après 5 à 7 minutes, des stimulations importantes (de 25 à 40 volts) sont inefficaces. La récupération de l'activité électrique est obtenue en 15 minutes en perfusant par la solution dépourvue d'inhibiteur.

2 - Action des ions Mn^{2+} .

Pendant les premières minutes d'action la durée du P.A. est légèrement augmentée par allongement du plateau. L'abaissement du plateau conduit progressivement à une vitesse de repolarisation constante. Vers la 10ème minute, la durée et l'amplitude du P.A. diminuent (Fig. 57 B). L'activité se maintient longtemps sous cette forme et après 45 minutes action environ le raccourcissement de la durée du P.A. s'accroît. La repolarisation présente un décours parabolique. L'amplitude du P.A. diminue progressivement et l'activité cesse après 60 à 80 minutes d'action de l'inhibiteur.

3 - Action du TEA.

L'allongement du plateau apparaît dès la première minute en présence de l'inhibiteur et s'accroît progressivement au cours de l'action. La durée du P.A. est doublée après 1 heure d'action. La phase ascendante et l'amplitude du P.A. ne sont pas affectées par le TEA. L'activité n'est jamais supprimée, même après une heure et demie ou davantage en présence de TEA (Fig. 58 A).

4 - Action du lanthane.

A ce stade du développement, les effets du lanthane sont très dépendants de la dose administrée. A la concentration habituelle (2 mM/l), l'inexcitabilité de la préparation intervient rapidement. Dès l'administration de l'inhibiteur, la durée du P.A. augmente légèrement, puis après une minute d'action elle diminue. La repolarisation s'effectue progressivement (Fig. 58 B). L'amplitude du P.A. n'est pas modifiée tant qu'une réponse électrique peut être obtenue. La préparation devient inexcitable après 3 minutes environ de séjour en présence de l'inhibiteur.

A la dose de 1 mM/l les effets observés sont plus nuancés et l'excitabilité est maintenue pendant une heure environ. Dès les premières minutes d'action, la durée du P.A. augmente. Cette augmentation de durée par allongement du plateau s'accroît progressivement. Après une heure, la durée du P.A. est doublée. Le début du plateau est déprimé précocement et présente une phase rapide de repolarisation qui s'accroît progressivement (Fig. 58 C). La phase ascendante n'est jamais modifiée et le P.M.R. reste stable.

V. - Conclusions.

L'action des inhibiteurs de perméabilité ionique réalisée sur le myocarde ventriculaire de l'embryon de poulet à divers stades du développement, conduit à un certain nombre de conclusions.

La TTX ne supprime pas l'activité spontanée du coeur de l'embryon de 2 jours, alors qu'au 3ème jour de l'incubation elle cesse en 5 à 10 minutes en présence de l'inhibiteur. Toutefois, la vitesse de la phase ascendante du P.A. du ventricule embryonnaire de 2 jours est notablement réduite. Cette observation suggère l'existence, dès le stade de 2 jours, d'une perméabilité sodique rapide. L'application de courants hyperpolarisants transmembranaires peu après l'administration de TTX permet l'activation de cette perméabilité rapide. Au contraire, après un temps d'action plus long de l'inhibiteur, la perméabilité rapide ne peut plus être initiée, alors que l'activité spontanée est maintenue. Cette persistance de l'activité en présence de TTX conduit à admettre l'existence d'une perméabilité de cinétique lente participant à l'électrogenèse.

Au deuxième jour du développement, l'administration d'ions Mn^{2+} , tout en modifiant le décours de l'activité électrique, en permet le maintien. Ces résultats montrent qu'à ce stade du développement embryonnaire l'inhibiteur de la perméabilité rapide ou celle de la perméabilité lente ne supprime pas l'activité. Par contre, l'administration simultanée de TTX et d'ions Mn^{2+} supprime rapidement l'activité. Par conséquent, le courant entrant responsable du développement de la phase ascendante du P.A. peut emprunter indifféremment un canal de cinétique rapide du type sodique ou un canal lent de nature calcico-sodique, l'un ou l'autre de ces deux types de perméabilité ionique pouvant suffire à assurer l'électrogenèse mais sous une forme altérée, ce qui suggère que normalement les deux canaux membranaires existent dès ce stade.

Au 3ème jour de l'incubation, la TTX supprime en 5 minutes l'activité spontanée. Les ions Mn^{2+} ralentissent la partie terminale de la phase ascendante sans modifier sa partie initiale. Ces résultats montrent qu'à ce stade la participation de la perméabilité sodique rapide dans la genèse du P.A. est devenue indispensable. Dans quelques cas nous avons observé, par administration de TTX, pour des stades compris entre 36 et 40 somites, une dissociation dans la phase ascendante du P.A. La TTX, ralentissant essentiellement la première phase et les ions Mn^{2+} diminuant la partie terminale de la phase ascendante, il est vraisemblable que cette dissociation créée par la TTX correspond à des perméabilités ioniques de cinétiques différentes. Une observation comparable a été faite par BERNARD (1970 a) sur le ventricule embryonnaire de rat de 13 jours: au tout début de son action la TTX dissocie nettement les deux composantes de la phase ascendante puis, progressivement, l'ensemble de la phase ascendante est ralentie.

Cette dissociation en deux composantes de la phase ascendante du P.A. permet de penser que la suppression de l'activité électrique ventriculaire du coeur de 3 jours par la TTX est due à une élévation du seuil d'activation du canal lent par rapport aux stades embryonnaires plus jeunes. A deux jours, le seuil plus bas de ce canal permettrait son fonctionnement et le développement d'un courant entrant électrogène.

Les effets de la TTX et des ions Mn^{2+} à ces stades du développement sont en accord avec les résultats obtenus par les modifications de concentration en ions Na^+ et Ca^{2+} des solutions de perfusion. En effet le coeur embryonnaire se montre plus sensible aux privations sodiques au 3ème jour qu'au 2ème jour du développement; la vitesse et l'amplitude de la phase ascendante du P.A. sont plus altérées par les milieux hypocalciques au 2ème jour qu'au 3ème jour de l'incubation.

L'administration de TTX aux coeurs embryonnaires de 4 jours et de 19 jours conduit rapidement à la suppression de l'activité électrique. La phase ascendante des P.A. est immédiatement modifiée en vitesse et en amplitude. Les effets produits par la TTX miment ceux qui sont observés en milieu Ty-Na0. Le ralentissement de l'ensemble de la phase ascendante et sa diminution d'amplitude par la TTX et par les milieux hyposodiques mettent en évidence l'importance dans le myocarde ventriculaire de la participation de la perméabilité sodique rapide dès le stade de 4 jours de développement embryonnaire.

Les ions Mn^{2+} modifient la partie terminale de la phase ascendante et le début de la repolarisation de l'activité électrique du ventricule embryonnaire de 4 jours. Les milieux hypocalciques affectent également le sommet de cette phase. Ces modifications produites tant par les ions Mn^{2+} que par les milieux hypocalciques ne se manifestent plus dans le cas du lambeau ventriculaire du coeur embryonnaire de 19 jours. Au 4ème jour du développement la perméabilité lente de la phase ascendante existe, mais n'intervient que dans sa partie terminale. Au 19ème jour de l'incubation, le développement de la phase ascendante dépend exclusivement d'une perméabilité sodique rapide. La diminution de la durée des P.A. produite par l'action des ions Mn^{2+} met en évidence l'existence d'un canal lent qui serait à l'origine du plateau des réponses cardiaques. A tous les stades du développement le raccourcissement du P.A. apparaît tant sous l'action du manganèse que dans les solutions de perfusion hypocalciques. L'évolution de la perméabilité lente calcico-sodique participant à la phase ascendante des P.A. et au début du plateau, au cours du développement embryonnaire, est schématisée par la figure 59.

Les effets produits par le TEA sur l'activité électrique ventriculaire à divers stades de l'ontogenèse apportent un argument supplémentaire à la conception d'une évolution de la perméabilité lente au cours du développement. Le TEA, considéré comme un inhibiteur de la perméabilité potassique retardée, augmente la durée du P.A. (NOBLE, 1962; MAC ALLISTER et NOBLE, 1966). Toutefois, le TEA affecte la vitesse de la phase ascendante du P.A. et modifie le potentiel diastolique des stades jeunes du développement. Il faut donc admettre, avec GARNIER et ROUGIER (1969) et BERNARD et GARGOUÏL (1968 a, 1970 b), que les effets du TEA concernent également une inhibition au moins partielle du canal lent. Ainsi, au 2ème jour du développement, l'ensemble de la phase ascendante des P.A. ventriculaires est ralentie, alors qu'au 3ème jour le ralentissement se limite à la partie terminale de cette phase. Au 4ème jour du développement embryonnaire, le TEA affecte le sommet de la phase ascendante et le début du plateau qui présente alors une brève repolarisation rapide. La phase ascendante du P.A. ventriculaire de l'embryon de 19 jours ne présente pas ces modifications sous l'action du TEA. L'allongement de la durée des P.A., important surtout à partir du stade de 3 jours, permet de supposer l'existence d'une conductance potassique retardée.

L'action du lanthane sur l'activité électrique du coeur embryonnaire permet dans une certaine mesure de préciser l'importance des ions Ca^{2+} dans la perméabilité lente calcico-sodique. Les ions La^{3+} administrés au coeur de l'embryon de 2 jours produisent immédiatement la diminution de la vitesse de la phase ascendante du P.A. et l'activité est supprimée en moins de une minute. Au stade de 3 jours, les ions La^{3+} ralentissent tout d'abord la partie terminale de la phase ascendante, puis l'activité cesse rapidement. Cet inhibiteur produit des altérations de l'activité électrique plus profondes que les milieux hypocalciques. La comparaison des effets observés sur la phase ascendante du P.A. à ces deux stades du développement embryonnaire (2 jours et 3 jours d'incubation) mettent en évidence ici encore la réduction progressive de l'importance du canal lent dans la genèse de la phase ascendante. Les ions La^{3+} ne modifient, au stade de 4 jours, que l'extrémité de la phase ascendante et sont sans

effet sur celle du P.A. ventriculaire de l'embryon de 19 jours. Toutefois, à ce dernier stade, le début du plateau est déprimé, rappelant la modification créée par le TEA sur le P.A. du ventricule de l'embryon de 4 jours. Ce résultat met en évidence la participation des ions Ca^{2+} dans le début du plateau. Si le lanthane peut être considéré comme un inhibiteur calcique du canal lent, la suppression de l'activité spontanée des ventricules d'embryons de 2 et 3 jours ne devrait pas apparaître aussi précocement. En effet, au 2ème jour du développement embryonnaire, la perméabilité sodique rapide suffit au maintien de l'activité et au 3ème jour, les ions La^{3+} laissent persister, outre la perméabilité rapide, la perméabilité sodique lente. L'activité électrique du ventricule au 4ème jour du développement embryonnaire et plus encore au 19ème jour, ne devrait pas être supprimée par les ions La^{3+} du fait de la participation réduite du canal lent dans la genèse de la phase ascendante des P.A. Le lanthane doit donc exercer, en plus de l'inhibition calcique lente, d'autres effets sur les perméabilités ioniques que l'enregistrement des potentiels membranaires ne permet pas de visualiser. Le facteur dose paraît essentiel, puisqu'au 19ème jour l'administration de lanthane à la concentration de 1 mM/l permet un maintien prolongé de l'activité électrique. A la dose de 2 mM/l le lanthane pourrait également empêcher le passage des ions Na^{+} . Une telle hypothèse a été envisagée par BESSEAU, LENFANT et MIRONNEAU (1971) dans le cas des fibres sino-auriculaires de grenouille. Cette préparation, perfusée par du liquide de Ringer dépourvu de calcium et en présence d'EDTA, présente un important courant qui ne peut être que de nature sodique (GARNIER, ROUGIER, GARGOUIL et CORABOEUF, 1969). Or les ions La^{3+} (à la concentration de 2 mM), le supprime totalement. D'après l'ensemble de ces résultats il est donc difficile d'admettre une inhibition spécifique du courant calcique par le lanthane. L'observation de DUVERT concernant la fixation des ions La^{3+} sur les sites anioniques membranaires permet d'argumenter cette hypothèse.

B. EFFETS DES INHIBITEURS DE PERMEABILITE IONIQUE MEMBRANAIRE SUR
=====

L'ACTIVITE ELECTRIQUE DU TISSU MYOCARDIQUE EN CULTURE IN VITRO.
=====

Les expériences ont été réalisées sur des fragments ventriculaires de coeurs embryonnaires de 4 jours cultivés dans le milieu liquide de RINALDINI et sur du tissu myocardique différencié en culture en milieu liquide par le mésoderme isolé de l'aire cardiaque. Par ailleurs, nous avons éprouvé l'action de la TTX et des ions Mn^{2+} sur des tubes cardiaques différenciés en milieu liquide à partir de l'aire cardiaque totale, sans isolement du feuillet mésodermique.

I. - Action des inhibiteurs de perméabilité ionique sur l'activité électrique des fragments ventriculaires en culture in vitro.

Les fragments ventriculaires ont été soumis à l'action des inhibiteurs après 5 et 11 jours de culture. Les modifications de l'activité électrique par les inhibiteurs ne montrent pas de différences en fonction du temps de culture.

1 - Action de la TTX.

Les modifications de l'activité électrique ventriculaire décrites dans le cas de l'embryon de 4 jours peuvent être observées sur les fragments ventriculaires cultivés in vitro. La vitesse de la phase ascendante est diminuée dès l'administration de TTX. L'amplitude et la durée du P.A. diminuent également. La pente de la dépolarisation diastolique est augmentée (Fig. 60 A). L'activité cesse après 10 à 12 minutes de séjour en présence de l'inhibiteur.

2 - Action des ions Mn^{2+} .

La vitesse de la partie terminale de la phase ascendante est ralentie dès les premières minutes d'action de l'inhibiteur. L'amplitude et la durée du P.A. diminuent. Après 45 minutes environ de séjour en présence des ions Mn^{2+} , l'ensemble de la phase ascendante est ralentie (Fig. 60 B). L'activité spontanée est maintenue pendant plus d'une heure.

3 - Action du TEA.

Dès la première minute d'action du TEA, la durée du P.A. augmente par allongement du plateau. La vitesse de la phase ascendante est ralentie dans sa partie terminale et ce n'est qu'après 45 à 60 minutes qu'un faible ralentissement affecte l'ensemble de la phase ascendante. La durée du P.A. augmente progressivement et est doublée par rapport à la valeur initiale après 10 minutes. L'amplitude du P.A. n'est pas modifiée, même après 60 minutes d'action. La repolarisation ne présente plus les deux phases habituelles mais se fait à vitesse constante (Fig. 61 A). L'activité n'est jamais supprimée (7 cas).

4 - Action du lanthane.

Les effets des ions La^{3+} apparaissent rapidement. Dès la première minute, la vitesse de la phase ascendante est diminuée en même temps que l'amplitude du P.A. est réduite. La repolarisation ne présente plus de plateau, et la membrane se repolarise à vitesse constante. La diminution de la vitesse de la phase ascendante et de l'amplitude du P.A. s'accroissent et l'activité spontanée cesse après 4 à 6 minutes en présence de l'inhibiteur (Fig. 61 B).

II. - Action des inhibiteurs de perméabilité ionique sur l'activité électrique du tissu myocardique différencié en culture *in vitro* à partir du mésoderme précardiaque explanté isolément.

Le tissu myocardique différencié en culture *in vitro* en milieu liquide a été soumis à l'action des inhibiteurs après 7 jours de culture.

1 - Action de la TTX.

La TTX ne produit pas de modification de l'activité électrique. Celle-ci est maintenue dans tous les cas (11 explants). L'amplitude, la vitesse de la phase ascendante et la durée du P.A. restent stables même après une heure de séjour en présence de l'inhibiteur (Fig. 62 A). L'application de courants hyperpolarisants ne produit pas une augmentation notable de la phase ascendante (Fig. 62 B).

2 - Action des ions Mn^{2+} .

Si les ions Mn^{2+} sont administrés à une préparation soumise à l'action de la TTX, l'arrêt de l'activité se produit quasi instantanément.

Administrés seuls, les ions Mn^{2+} conduisent à la suppression de l'activité électrique en 2 minutes. La fin du plateau est déprimé rapidement. Toutefois, l'amplitude du P.A. n'est pas affectée. La vitesse de la phase ascendante est ralentie et l'arrêt de l'activité intervient sans apparition d'altérations plus profondes de l'activité électrique (Fig. 62 C.). Après l'arrêt de l'activité spontanée, la préparation est inexcitable.

3 - Action du lanthane.

Si l'inhibiteur est administré à la concentration habituelle de 2 mM/l, l'activité est supprimée instantanément. A la concentration de 1 mM/l, l'activité cesse en 15 secondes au cours desquelles la durée du P.A. et son amplitude sont diminuées et la vitesse de la phase ascendante considérablement ralentie (Fig. 63 A). Cette sensibilité de l'activité électrique à l'égard des ions La^{3+} nous a conduit à utiliser des concentrations de 0,5 mM/l de lanthane. A cette concentration, les modifications de l'activité électrique sont plus progressives, mais conduisent à l'arrêt en une minute environ (Fig. 63 B).

4 - Action du TEA.

Le TEA produit en 2 minutes d'action une diminution de la vitesse de la phase ascendante et une augmentation de la durée du P.A. ; la pente de dépolarisation lente diastolique est augmentée. Ces modifications s'accroissent au cours du temps d'action de l'inhibiteur (Fig. 64 A). Toutefois, l'amplitude du P.A. et le P.M.R. ne sont diminués qu'après des séjours d'une heure environ en présence de l'inhibiteur.

Après un long temps d'action du TEA (une heure et demie à deux heures), des oscillations de l'activité électrique apparaissent. Ces oscillations se produisent durant la phase lente de repolarisation. Le nombre des oscillations aug-

mente progressivement. Leur niveau de dépolarisation n'atteint jamais celui de la phase ascendante du P.A. sur lequel elles se greffent; leur niveau de repolarisation augmente et atteint progressivement la valeur du P.M.R. Parfois, ces oscillations s'amortissent puis augmentent progressivement d'amplitude jusqu'à la valeur du P.M.R. qui n'est plus que de 40 mV environ (Fig. 64 B).

III. - Action des inhibiteurs de perméabilité ionique sur l'activité électrique des tubes cardiaques différenciés en culture in vitro.

Les tubes cardiaques différenciés en culture in vitro en milieu liquide à partir de l'aire cardiaque ont été soumis à l'action de la TTX et des ions Mn^{2+} . Nous nous sommes limités à l'étude des modifications de l'activité électrique de la chambre ventriculaire du tube cardiaque.

1 - Action de la TTX.

La vitesse de la phase ascendante et l'amplitude du P.A. sont très rapidement diminuées. Toutefois, l'activité électrique ainsi modifiée persiste toujours, même après un séjour de plus d'une heure en présence de l'inhibiteur (Fig. 65 A).

2 - Action des ions Mn^{2+} .

Les ions Mn^{2+} produisent une diminution de la vitesse de la phase ascendante et une réduction de l'amplitude du P.A. dont la durée n'est pas modifiée. L'activité électrique persiste sous cette forme pendant 45 minutes environ (Fig. 65 B).

L'administration simultanée des deux inhibiteurs supprime instantanément l'activité électrique des tubes cardiaques.

Il apparaît donc que les perméabilités ioniques membranaires ne sont pas identiques dans le cas du tissu myocardique différencié in vitro à partir du mésoderme précardiaque cultivé isolément et dans celui du tube cardiaque qui se forme en culture lorsque les trois feuillets embryonnaires du niveau de l'aire cardiaque sont explantés. Ces deux conditions expérimentales modifient l'évolution histogéné-

tique et morphogénétique du mésoderme précardiaque et, de la même façon, influent sur le niveau de différenciation atteint en culture.

IV. - Conclusions.

Les fragments ventriculaires de coeur embryonnaire de 4 jours présentent, sous l'effet des inhibiteurs, des modifications proches de celles qui sont observées dans le cas du ventricule de l'embryon de 4 jours. Toutefois, la perméabilité calcique semble plus importante que dans le ventricule in situ puisque les ions La^{3+} suppriment l'activité en 5 minutes environ. Bien que le courant entrant lent participant à la phase ascendante ne permette pas à lui seul le maintien de l'activité spontanée, les ions Ca^{2+} jouent un rôle essentiel dans le développement de ce courant dans la mesure où l'on attribue aux ions La^{3+} une spécificité dans l'inhibition de la perméabilité calcique. Mais les ions Mn^{2+} permettant la persistance de l'activité spontanée, cette spécificité exclusive du lanthane vis-à-vis du calcium apparaît à nouveau peu probable. En effet, dans les solutions Ty-Ca0 l'activité électrique est durable (45 minutes environ), alors que les solutions Ty-Na0 et Ty-Na/10 la suppriment en 5 minutes environ.

Le tissu myocardique différencié en culture à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque présente une activité électrique insensible à l'action de la TTX. Les ions Mn^{2+} , par contre, la supprime très rapidement. Ce résultat nous conduit à admettre que la phase ascendante du P.A., lente sur ces préparations (4,7 V/s), est due à une perméabilité de cinétique lente. D'autre part, l'administration des solutions Ty-Ca0 produit en 2 minutes la cessation de l'activité et celle des ions La^{3+} la supprime immédiatement; de plus, les milieux Ty-Na/10 ou Ty-Na0 ne modifient pas la vitesse de la phase ascendante. Ces résultats permettent de conclure que la phase ascendante du P.A. des cardiomyoblastes de cette préparation est due exclusivement à une perméabilité lente. Le courant ionique calcico-sodique qui l'emprunte pourrait être essentiellement calcique. Cette préparation semble donc réaliser un état très peu évolué des propriétés membranaires des cellules cardiaques embryonnaires.

Lorsque les trois feuillets de l'aire cardiaque sont explantés, le tissu myocardique, qui se différencie, réalise un début d'organogenèse et de morphogenèse rappelant le tube cardiaque embryonnaire jeune. Le comportement de ce tissu myocardique vis-à-vis des inhibiteurs est alors différent du précédent. En effet, l'administration de TTX ou celle de manganèse reproduisent les modifications de l'activité électrique observées sur le coeur embryonnaire de 2 jours. Le contact avec un feuillet épithélial freine la prolifération du mésoderme précardiaque et favorise au contraire l'histogenèse et la morphogenèse. Ces conditions de différenciation permettent l'acquisition de la perméabilité membranaire sodique rapide. Par contre, dans les conditions où la multiplication cellulaire des cardiomyoblastes aboutit à la formation d'une structure compacte, la différenciation se limite à l'apparition d'une perméabilité de cinétique lente, essentiellement calcique, qui représenterait le fonctionnement initial cardiaque (voir 1ère partie, chapitre IV). BERNARD et GARGOUIL (1970 b) ont montré que l'activité électrique ventriculaire de l'embryon de rat de 10 jours est due à une perméabilité de type lent et que la membrane myocardique à ce stade du développement se comportait comme une électrode au calcium. On peut penser, compte tenu de ces résultats, que dans le développement normal de l'embryon de poulet l'automatisme ventriculaire caractéristique du fonctionnement initial cardiaque, résulte d'une activité électrique due à des perméabilités lentes où les ions Ca^{2+} auraient un rôle prépondérant dans la genèse du P. A.

L'administration de TEA sur le tissu myocardique différencié en culture à partir du mésoderme isolé a montré, outre les effets classiques, l'apparition d'oscillations au cours de la repolarisation. Des modifications du décours de la repolarisation et l'apparition d'oscillations ont été observées sous l'effet de modifications de facteurs externes tels que l'action de taux élevés de CO_2 sur les fibres de Purkinje par CORABOEUF et BOISTEL (1953) et par CARMELIET (1961 b). La réduction de la teneur externe en ions K^+ de la solution de perfusion de même que l'anoxie (TRAUTWEIN, 1964) produisent des effets analogues. Ces oscillations peuvent apparaître spontanément sur des fibres de Purkinje lésées au cours de leur prélèvement (HAUSWIRTH, NOBLE et TSIEN, 1969). Pour ces derniers auteurs, les oscillations obtenues à des potentiels membranaires réduits résulteraient de l'activation de i_{x1} par dépla-

cement du potentiel de membrane. Si dans une préparation automatique (où l'automatisme est contrôlé par une variable d'activation s) le potentiel membranaire a une valeur comprise entre -40 et -20 mV, le niveau d'activation de i_{x_1} est atteint et produit des oscillations. D'après WEIDMANN (1955 b) et NOBLE (1962) il semble vraisemblable d'admettre que le courant entrant responsable de l'amplitude des oscillations serait de nature sodique et représenterait le courant sodique résiduel qui pourrait se produire quand la variable d'inactivation (h) a atteint sa valeur stable. CARMELIET (1961) apporte un argument à cette hypothèse en montrant que les oscillations obtenues en milieu hypopotassique disparaissent si le sodium est supprimé du liquide de perfusion.

Les résultats que nous avons obtenus ont permis d'apporter des précisions sur l'intervention des conductances sodique et calcique dans la genèse de la phase ascendante du P.A. ventriculaire à divers stades du développement cardiaque chez le poulet. Par contre, les caractéristiques de la conductance potassique n'ont pu être précisées par l'utilisation des milieux hypopotassiques et des inhibiteurs. L'étude de ce problème fait l'objet du chapitre suivant.

Cinquième partie :

=====

EFFETS DES COURANTS IMPOSES TRANSMEMBRANAIRES AU COURS
DE LA DIFFERENCIATION CARDIAQUE. RELATIONS COURANT-POTENTIEL.

A. - Effets des courants imposés transmembranaires sur le potentiel
membranaire des myoblastes ventriculaires embryonnaires à
différents stades du développement.

I - Relations courant-potentiel du ventricule de l'embryon de
2 jours.

II - Relations courant-potentiel dans le cas du ventricule
embryonnaire de 4 jours.

III - Relations courant-potentiel dans le cas du ventricule
embryonnaire de 19 jours.

B. - Effets des courants imposés sur le potentiel de membrane des
myoblastes différenciés en culture in vitro.

C. - Conclusions.

Dans le cas du tissu myocardique embryonnaire, l'étude des conductances ioniques ne peut être entreprise par les techniques du voltage imposé. L'emploi des inhibiteurs de perméabilité ionique nous a permis de préciser l'évolution des conductances aux ions Na^+ et Ca^{2+} des membranes des myoblastes cardiaques au cours de leur différenciation, mais ne nous a pas renseignés de façon précise sur la conductance potassique. Nous nous proposons présentement d'étudier l'évolution de la conductance potassique au cours du développement embryonnaire en utilisant la technique du passage transmembranaire de courants.

WEIDMANN (1951) a montré qu'au cours du plateau du P.A. des fibres de Purkinje la résistance membranaire est élevée. Cette observation montrait à l'évidence que la repolarisation des P.A. ne pouvait être exclusivement due, dans le cas des cellules cardiaques, à un ralentissement des phénomènes responsables de la repolarisation des P.A. nerveux (rectification retardée). Cette augmentation de résistance membranaire a suggéré à divers auteurs l'existence d'une diminution de la conductance potassique au cours du plateau du P.A. (CORABOEUF, ZACOUTO, GARGOUIL et LAPLAUD, 1958; BRADY et WOODBURY, 1960). Cette diminution de conductance est bien connue dans le cas du tissu musculaire squelettique et a été appelée rectification anormale par opposition à la rectification normale (ou retardée) caractéristique du tissu nerveux.

Les propriétés rectificatrices des membranes des myoblastes cardiaques ont été étudiées par WEIDMANN (1955 c), puis par CARMELIET (1961 a), par HALL, HUTTER et NOBLE (1961) et par TRAUTWEIN et KASSEBAUM (1961) sur les fibres de Purkinje. Ces auteurs ont montré que la conductance de membrane diminuait lors d'une dépolarisation (rectification anormale) et que, pour les fortes dépolarisations, on pouvait mettre en évidence une faible augmentation retardée (rectification retardée).

Afin de savoir si le coeur embryonnaire de poulet à divers stades du développement présentait les propriétés rectificatrices des membranes cardiaques et notamment si la diminution de la durée du P.A. au cours de l'ontogenèse était due

à l'établissement d'une perméabilité potassique retardée, nous avons appliqué des courants hyperpolarisants et dépolarisants de longue durée (1 700 ms) aux membranes des myoblastes cardiaques. La technique utilisée a été décrite au chapitre "Matériel et Méthodes" (IV - 4). Pour éliminer les variations de potentiel dues à l'apparition de réponses propagées et régénératives par des courant dépolarisants, nous avons supprimé les ions Na^+ et Ca^{2+} du liquide de Tyrode perfusant les préparations.

A - EFFETS DES COURANTS IMPOSES TRANSMEMBRANAIRES SUR LE POTENTIEL

MEMBRANAIRE DES MYOBLASTES VENTRICULAIRES EMBRYONNAIRES A

DIFFERENTS STADES DU DEVELOPPEMENT.

Nous avons établi les relations courant-potentiel sur le tissu ventriculaire au 2ème jour, au 4ème jour et au 19ème jour du développement embryonnaire.

I. - Relations courant-potentiel du ventricule de l'embryon de 2 jours.

Les courants de valeurs comprises entre -6 et $+5.10^{-7}$ A font varier le potentiel de membrane de -110 mV à $+20$ mV en prenant comme potentiel de référence celui qui est obtenu lorsque la microélectrode d'enregistrement est extracellulaire (zéro). Au moment de l'établissement du courant transmembranaire, le potentiel membranaire présente un décours correspondant à la charge membranaire, puis atteint un niveau stable jusqu'à la fin de l'impulsion. Pour des courants hyperpolarisants et dépolarisants de même valeur, les variations opposées du potentiel membranaire présentent le même décours et la même amplitude (Fig. 66 A). Ce résultat montre que la résistance membranaire, et par conséquent la conductance de la membrane myocardique, reste stable pour des courants de même valeur mais de sens opposés (courants anodiques et cathodiques). La courbe traduisant les variations du potentiel membranaire en fonction de l'intensité du courant délivré est une droite (Fig. 66 E). Cette relation linéaire indique qu'à ce stade du développement les membranes des cardiomyoblastes ne présentent pas de propriétés rectificatrices et se comportent donc comme des résistances ohmiques.

II. - Relations courant-potentiel dans le cas du myocarde embryonnaire de 4 jours.

Les résultats obtenus diffèrent de ceux qui ont été obtenus dans le cas du coeur de 2 jours. Pour des courants de même valeur, mais de sens opposés, le potentiel membranaire n'évolue pas de façon symétrique. Ainsi, un courant anodique de $3 \cdot 10^{-7}$ A augmente le potentiel de membrane de 25 mV, alors qu'un courant cathodique de même intensité le diminue de 40 mV. Cette dissymétrie indique l'existence d'une rectification anormale.

D'autre part, lorsque la dépolarisation membranaire atteint 40 à 45 mV, le potentiel membranaire n'est pas stable. Après avoir atteint un maximum, il diminue jusqu'à la fin de l'impulsion. Cette diminution de la valeur du potentiel traduit une diminution de la résistance membranaire au cours du temps, c'est-à-dire une augmentation de la conductance dans le temps (Fig. 66 B). Cette évolution de la conductance montre la présence d'une rectification retardée à ce stade du développement. La courbe courant-potentiel présente un décours en S qui traduit la présence d'une rectification anormale et d'une rectification retardée (Fig. 66 E).

III. - Relations courant-potentiel dans le myocarde ventriculaire embryonnaire de 19 jours.

Les résultats qui sont obtenus à ce stade du développement diffèrent peu de ceux que l'on observe au 4^{ème} jour du développement. Toutefois, la dissymétrie entre les valeurs de potentiels obtenues lors de l'application de courants de même intensité mais de sens opposé, s'accroît (Fig. 66 C). Pour un courant hyperpolarisant de $3 \cdot 10^{-7}$ A, le potentiel membranaire augmente de 25 mV, alors que la même intensité de courant dépolarisant le diminue de 30 mV seulement. Cette différence d'évolution du potentiel membranaire vis-à-vis d'une même valeur du courant transmembranaire souligne la difficulté de la mise en évidence de la rectification retardée à ce stade du développement. Seules les dépolarisations membranaires importantes ou supérieures à 55 mV nécessitant des courants de 5 à $8 \cdot 10^{-7}$ A, permettent d'observer une évolution du potentiel durant l'impulsion.

La courbe courant-potentiel présente un décours sigmoïde (Fig. 66 E) traduisant des variations de la conductance membranaire en fonction du niveau de potentiel.

En résumé, la membrane myocardique ventriculaire de l'embryon de 2 jours présente des propriétés électriques linéaires. Au 4ème jour de l'incubation et aux stades suivants le décours sigmoïde de la courbe courant-potentiel traduit l'existence des phénomènes de rectification.

B - EFFETS DES COURANTS IMPOSES SUR LE POTENTIEL DE MEMBRANE DES
=====

MYOBLASTES DIFFERENCIES EN CULTURE IN VITRO.
=====

Les expériences ont été réalisées sur les myoblastes du tissu cardiaque différencié en culture in vitro à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque.

Pour des variations d'intensité comprises entre $-6 \text{ et } +6 \cdot 10^{-7} \text{ A}$, le potentiel membranaire varie de -110 mV à $+10 \text{ mV}$. Les courants cathodiques et anodiques de même intensité produisent des variations de potentiel en sens opposés, mais de même amplitude. Les dépolarisations importantes de la membrane n'entraînent pas une évolution de son potentiel au cours du passage du courant (Fig. 66 D). Ces résultats se traduisent par une courbe courant-potentiel qui est linéaire (Fig. 66 E). Les membranes des myoblastes cardiaques du tissu différencié en culture in vitro ne présentent pas de propriétés rectificatrices et se comportent d'une façon analogue à celles des myoblastes du ventricule de l'embryon de 2 jours.

C - CONCLUSIONS.
=====

Aux stades précoces du développement cardiaque (2ème jour de l'incubation) la membrane myocardique dans les milieux Ty-Na0 et Ty-Ca0 se comporte comme une résistance ohmique à l'égard des courants hyperpolarisants et dépolarisants. Un résultat analogue est obtenu dans le cas des myoblastes différenciés en culture in vitro. Dès le 4ème jour de l'incubation, la résistance membranaire est plus importante lors de l'application d'un courant dépolarisant (sortant) que lors de l'application d'un courant hyperpolarisant de même amplitude. La conductance de membrane est plus faible pour les courants sortants que pour les courants entrants; il existe donc

à ce stade une rectification anormale comparable à celle qui existe dans le cas de la fibre de Purkinje (WEIDMANN, 1955 c; HALL, HUTTER et NOBLE, 1953), de la fibre sino-auriculaire de grenouille (ROUGIER, VASSORT et STÄMPLI, 1968 b) et de la membrane des fibres musculaires squelettiques (KATZ, 1949; HODGKIN et HOROWICZ, 1959; FREYGANG et ADRIAN, 1961; NAKAJIMA, IWASAKI et OBATA, 1962; ROUGIER, VASSORT et ILDEFONSE, 1968). Pour des courants dépolarisants de forte intensité, on observe une augmentation dans le temps de la conductance membranaire. Ce phénomène est assimilable à une rectification retardée. Les ions Na^+ et Ca^{2+} étant supprimés du liquide de Tyrode, cette augmentation de conductance ne peut être due qu'à un accroissement de la conductance potassique. Ainsi, dès que l'on s'éloigne du potentiel d'équilibre au potassium, la perméabilité pour cet ion n'est plus constante; une dépolarisation provoque une diminution de la perméabilité et une hyperpolarisation, une augmentation de perméabilité potassique.

L'existence d'une rectification retardée d'apparition précoce peut expliquer la diminution de la durée du P.A. au cours du développement embryonnaire. La durée des P.A. ventriculaires, de 240 ms en moyenne au 2ème jour, n'est plus que 200 ms en moyenne au 19ème jour de l'incubation. Dans le cas du tissu myocardique différencié à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque, la durée prolongée du P.A. (280 ms) peut être liée également à l'absence de rectification retardée. Toutefois, à tous les stades du développement considérés, le TEA produit un allongement de la durée du P.A. L'augmentation de la durée du P.A. des myoblastes du coeur de l'embryon de 2 jours sous l'influence du TEA peut être due à la diminution de la perméabilité potassique de repos. Le potentiel d'équilibre au potassium étant inférieur à sa valeur normale, la dépolarisation se maintient plus longtemps du fait d'une "driving force" plus faible et la durée du P.A. augmente. L'augmentation de la durée des P.A. par le TEA pour des stades plus avancés du développement peut être due à une diminution de la perméabilité potassique retardée. Ceci suggère que la réduction de la durée des P.A. enregistrée au cours du développement embryonnaire est provoquée par une augmentation progressive de la perméabilité potassique.

Nous avons mentionné les difficultés de mise en évidence de la rectification retardée dans le cas des membranes des myoblastes cardiaques au 19ème jour de l'incubation. Les propriétés rectificatrices et surtout la rectification retardée apparaissent pour des niveaux de potentiel supérieurs à ceux des membranes cardiaques du coeur de l'embryon de 4 jours. Toutefois, il paraît difficile de conclure que les propriétés rectificatrices de la membrane sont moins importantes à 19 jours d'incubation qu'à 4 jours. En effet, au 19ème jour du développement, la propagation des impulsions n'est pas uniforme, ce qui tend à masquer les propriétés électriques non linéaires de la membrane. Cette critique, formulée par NOBLE (1962, 1966) à propos des résultats obtenus par JOHNSON et TILLE (1960, 1961) dans une étude des relations courant-potentiel sur le ventricule de lapin peut s'appliquer au lambeau ventriculaire provenant d'embryons de 19 jours d'incubation. La conduction tridimensionnelle du courant peut être la cause des hauts niveaux de potentiel nécessaires à la mise en évidence de la rectification retardée. Par contre, dans le cas du ventricule d'embryons de 4 jours et mieux encore de 2 jours et pour les myoblastes différenciés en culture in vitro, la structure myocardique s'apparente davantage au système de type câble auquel on assimile les fibres de Purkinje et les résultats obtenus dans ces conditions nous paraissent plus fiables.

Ces résultats montrent que les conductances potassiques, et notamment la conductance potassique retardée, interviennent précocement au cours du développement. Ces résultats diffèrent sur le plan chronologique de ceux qui ont été obtenus dans le cas du ventricule embryonnaire de rat par BERNARD et GARGOUIL (1970 b) où la perméabilité potassique retardée n'intervient qu'au 16ème jour de la gestation et augmente progressivement jusqu'à la naissance. Il apparaît donc que la chronologie des modifications membranaires liées à la différenciation cardiaque présente un net décalage entre le cas de l'embryon de rat et celui de l'embryon de poulet.

Les propriétés rectificatrices de la membrane des cardiomyoblastes de l'embryon de poulet, mises en évidence dès le 4ème jour de l'incubation, correspondent à un état de différenciation qui n'est pas maintenu dans les conditions de la

culture histiotypique. En effet, SPERELAKIS et LEHMKÜHL (1964) ont obtenu, sur des myoblastes ventriculaires provenant d'embryons de poulet de 6 à 8 jours d'incubation et cultivés in vitro, des relations courant-potentiel qui sont linéaires.

CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons étudié certains aspects de la différenciation cardiaque chez l'embryon de poulet. Les résultats qui ont été reportés dans ce mémoire et qui entrent dans le cadre de l'étude de la différenciation cellulaire et de la physiologie du coeur embryonnaire poursuivie au Laboratoire, nous amènent à formuler un certain nombre de conclusions.

A. - Potentialités de différenciation du mésoderme précardiaque.

La différenciation in vitro des cellules du mésoderme de l'aire cardiaque peut être obtenue dès un stade très précoce du développement embryonnaire. Les cellules cardiaques présomptives sont donc déterminées très tôt, comme l'ont montré les travaux de G. LE DOUARIN et coll. (1965, 1966) utilisant soit la technique des greffes coelomiques, soit la méthode de culture sur milieu gélosé de WOLFF et HAFFEN (1952). Par ailleurs, dès le stade du prolongement céphalique des myofibrilles sont présents, bien que rares, dans les futures cellules cardiaques (G. LE DOUARIN, 1965). Les expériences de culture in vitro montrent que la progression de la différenciation ne requiert pas la présence de l'endoderme comme le pensaient ORTS-LLORCA (1963) et ORTS-LLORCA et RUANO-GIL (1965). Cette capacité d'autodifférenciation s'observe également chez l'embryon de souris, puisque du tissu myocardique présentant une activité spontanée a été obtenu par G. LE DOUARIN et NANOT (1967 a) à partir du mésoderme précardiaque isolé au stade de la formation des premiers somites et cultivé in vitro.

Bien que la culture in vitro en milieu liquide (milieu de RINALDINI, 1959) soit propice à la culture du tissu cardiaque, l'autodifférenciation du mésoderme pré-

cardiaque s'accompagne d'une prolifération cellulaire importante, mais ne comporte pas une évolution histogénétique et morphogénétique normale. La structure myocardique de l'explant est compacte, sans cavité centrale.

La formation d'une structure myocardique tubulaire s'accomplit par contre si le mésoderme évolue au contact d'un feuillet épithélial. Cette évolution peut être obtenue lorsque le mésoderme est associé à des lambeaux épithéliaux prélevés en dehors de l'aire cardiaque ou placé au contact d'un film de collagène (SUIGNARD, 1973), ce qui exclue un rôle spécifique de l'endoderme de l'aire cardiaque à l'égard de cette différenciation. Lorsque les conditions expérimentales provoquent l'organisation d'une structure creuse, la paroi myocardique est mince, formée de quelques couches de cellules seulement. Toutefois, l'histogenèse et la morphogenèse cardiaques se rapprochent d'autant plus de la normale que les rapports entre les feuillets de l'aire cardiaque sont conservés.

Les deux évolutions différentes du mésoderme précardiaque, observées lorsque ce feuillet est cultivé isolément ou placé au contact d'un support favorable, mettent en évidence l'existence d'une compétition entre deux phénomènes: la prolifération cellulaire d'une part, l'histogenèse et l'organogenèse d'autre part. Cependant, dans les deux cas, les cellules précardiaques se différencient en cardiomyoblastes contractiles.

Ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes de différenciation des phases initiales du développement cardiaque. Les feuillets de l'aire cardiaque orientent l'évolution histogénétique et l'organogenèse aboutissant à la formation du tube cardiaque, mais n'exercent pas, du moins aux stades étudiés, une action inductrice spécifique sur la différenciation cellulaire du myocarde.

B. - Aspects physiologiques de la différenciation cardiaque.

I. Activité électrique du tissu myocardique.

Les résultats que nous obtenons montrent que l'activité électrique intracellulaire subit des modifications au cours du développement embryonnaire chez le poulet.

La vitesse de la phase ascendante et l'amplitude du P.A. augmentent au cours de la différenciation cardiaque. Dans le même temps, la durée des P.A. diminue. Ces changements de l'activité électrique cellulaire cardiaque au cours de l'ontogenèse résultent de modifications des perméabilités membranaires qui ont pu être mises en évidence par l'utilisation de solutions de perfusion de compositions ioniques variées et par l'emploi d'inhibiteurs de perméabilités ioniques.

ISHIMA (1968), SHIGENOBU et SPERELAKIS (1971), SPERELAKIS et SHIGENOBU (1972) observent que les milieux hyposodiques produisent un arrêt rapide de l'activité électrique des cardiomyoblastes ventriculaires de l'embryon de poulet à tous les stades du développement. YEH et HOFFMAN (1968), sur ce même matériel, ont obtenu un résultat analogue.

Nos résultats montrent que, dans un premier temps, les milieux hyposodiques produisent, à tous les stades du développement, une diminution de l'amplitude et de la durée du P.A., ainsi qu'un ralentissement de la phase ascendante. La suppression de l'activité électrique par ces milieux est ensuite obtenue d'autant plus rapidement que le stade du développement cardiaque est plus avancé. Cette augmentation de la sensibilité à la restriction sodique du myocarde au cours de sa différenciation suggère une participation de plus en plus importante des ions sodium dans la genèse de l'activité électrique. Contrairement à l'opinion de ISHIMA (1968) pour qui "les ions Na^+ sont préférables mais ne sont pas nécessaires à la genèse du P.A. ventriculaire aux jeunes stades du développement" (jusqu'au 7ème et 8ème jour de l'incubation), nous pensons que dès le 2ème jour du développement, la participation sodique à la genèse du P.A. est importante. L'administration de TTX au coeur de l'embryon de 2 jours précise ces résultats en montrant que le maintien de l'activité électrique ne nécessite pas à ce stade le fonctionnement d'un canal sodique rapide. De même, la persistance de l'activité spontanée après administration d'ions Mn^{2+} montre que l'inhibition du canal lent laisse subsister le développement de la phase ascendante du P.A., par le canal rapide. En d'autres termes, l'inhibition de l'un ou l'autre de ces canaux permet au stade de 2 jours le maintien de l'activité électrique. Par contre, dès le stade de 3 jours d'incubation, un seul de ces canaux ne suffit plus à assurer

le maintien de l'activité électrique ventriculaire. Cette activité est supprimée par la TTX: le caractère indispensable du fonctionnement du canal sodique rapide apparaît donc très tôt chez l'embryon de poulet et cette évolution membranaire des cardiomyoblastes ne peut être mise en relation avec l'établissement de l'innervation cardiaque qui ne survient que plus tardivement.

La participation des ions Ca^{2+} à l'électrogenèse cellulaire est importante aux stades initiaux de la différenciation cardiaque, puis diminue. Ainsi, le ralentissement de la vitesse de la phase ascendante du P.A. observé sous l'action des milieux hypocalciques ou en présence d'ions Mn^{2+} et La^{3+} , qui affecte au stade de 2 jours l'ensemble de cette phase, se limite progressivement, au cours du développement, à sa partie terminale. Le TEA ralentit également la vitesse de la phase ascendante du P.A. à partir d'un niveau de dépolarisation membranaire d'autant plus élevé que la différenciation cardiaque est plus avancée. Si l'on admet avec GARNIER et ROUGIER (1969) et BERNARD et GARGOUIL (1968a, 1970b) que les effets du TEA comportent une inhibition partielle du canal lent en plus de celle de la perméabilité potassique retardée, on peut attribuer l'évolution observée dans les effets du TEA sur la phase ascendante à une réduction progressive de la participation du canal lent à la genèse de la phase ascendante du P.A.

Les changements importants des perméabilités ioniques membranaires que nous avons observés au cours de la différenciation cardiaque chez l'embryon de poulet se situent à un stade nettement antérieur à l'établissement de l'innervation.

Le problème de l'influence éventuelle de l'innervation sur les caractéristiques fonctionnelles des cardiomyoblastes a fait l'objet d'études utilisant les cultures in vitro de cellules cardiaques provenant de la dissociation de coeurs embryonnaires. PAPPANO et SPERELAKIS (1969) dans le cas de cultures histiotypiques de cardiomyoblastes de ventricules de poulet du 9ème au 15ème jour du développement montrent que seuls les ions Na^{+} sont impliqués dans le courant entrant durant le P.A. Lorsque les myoblastes ventriculaires isolés sont placés dans une solution de Ringer dépourvue de sodium, 90 % des cardiomyoblastes cessent de se contracter et les auteurs mentionnent "qu'aucun signe d'activité électrique n'accompagne les contractions des cellules

qui en présentent". Bien que ces auteurs signalent l'importance de la perméabilité sodique et le rôle du canal sodique dans l'électrogenèse, ils n'observent pas de modification de l'activité électrique des cardiomyoblastes ventriculaires in situ après administration de TTX à la concentration de $4 \cdot 10^{-6}$ g/ml avant le 5ème jour de l'incubation. Ils attribuent cette insensibilité de l'activité électrique vis-à-vis de la TTX à l'absence de l'innervation cholinergique. Déjà en 1965 SPERELAKIS et LEHMKUHL interprétaient l'insensibilité à la TTX (10^{-5} et 10^{-6} g/ml) des cultures de cardiomyoblastes ventriculaires de coeur de poulet de 7 jours par l'absence d'innervation cholinergique.

La suppression de l'innervation cholinergique ne nous paraît pas devoir expliquer l'insensibilité à la TTX des cardiomyoblastes isolés en culture. En effet, des recherches en cours au Laboratoire sur des cellules cardiaques isolées d'embryons de poulet permettent d'éliminer cette interprétation. G. LE DOUARIN et J. F. RENAUD (communication personnelle) et J. F. RENAUD (1973) observent une insensibilité progressive des myoblastes cardiaques au cours du temps de culture. En effet, le pourcentage de cellules actives inhibées par la TTX est de 50 % environ après 4 heures de culture et de 35 % environ après 24 heures, puis la TTX devient inefficace après 48 heures de culture. Il semble que le traitement enzymatique utilisé pour dissocier le tissu myocardique (traitement par la trypsine) altère, de façon irréversible, les membranes cellulaires d'un pourcentage de cellules variable selon la technique utilisée et que, dans le cas des cellules ayant conservé la sensibilité à la TTX au moment de l'explantation, la perte de cette sensibilité se produit progressivement au cours du temps de culture. Pour ces cellules, l'électrogenèse initialement assurée par le canal rapide devient dépendante du fonctionnement du canal lent, comme en témoigne le développement de la sensibilité aux ions Mn^{2+} .

Un travail récent de PAPPANO (1972 b) réalisé sur l'oreillette embryonnaire de coeur de poulet de 6 jours met en évidence la participation d'un canal entrant calcique dans la genèse de l'activité électrique. La TTX administrée à la concentration de $2 \cdot 10^{-6}$ M modifie l'activité électrique: l'amplitude et la vitesse de la phase ascendante des P.A. atriaux de l'embryon de 6 jours sont considérablement

réduites. L'absence d'ions Ca^{2+} dans le milieu de perfusion provoque une diminution d'amplitude du P.A. et une diminution de la vitesse de la phase ascendante. Aux 12ème et 18ème jour de l'incubation, la TTX supprime rapidement l'activité spontanée. Cette augmentation de la sensibilité à la TTX au cours du développement serait due, selon cet auteur, à une augmentation du nombre des sites membranaires responsables de la perméabilité sodique rapide qui pourrait être en rapport avec l'établissement de l'innervation cholinergique.

Nos résultats présentent des différences avec ceux obtenus par les auteurs de l'école américaine. La sensibilité à la TTX apparaît bien antérieurement à l'établissement de l'innervation cholinergique qui s'établit vers le 5ème jour de l'incubation. L'administration d'ions Mn^{2+} montre nettement la diminution progressive de la participation de la perméabilité lente au cours de l'ontogenèse et les effets des ions La^{3+} et du TEA sont compatibles avec cette interprétation. Par ailleurs, ISHIMA (1968) a obtenu, par administration de TTX à la concentration de 10^{-6} g/ml, des modifications de l'activité électrique ventriculaire de l'embryon de poulet de 3 jours comparables à celles que nous obtenons (réduction de la vitesse de la phase ascendante, diminution d'amplitude).

L'utilisation de courants transmembranaires a permis de mettre en évidence la participation d'une perméabilité potassique retardée au 4ème jour de l'incubation, tandis qu'aux stades précoces du développement (2ème jour) la membrane des cardiomyoblastes ne présente pas de propriétés rectificatrices et se comporte comme une résistance ohmique vis-à-vis des courants hyperpolarisants et dépolarisants. Au 4ème jour du développement, les conductances potassiques "normale" et "anormale" existent, ce qui permet d'expliquer la diminution de la durée du P.A. au cours du développement embryonnaire.

L'ensemble de ces résultats diffère sur le plan chronologique de ceux qui ont été obtenus par BERNARD et GARGOUIL (1970 b) sur le ventricule embryonnaire de rat. Sur ce matériel, à 10 jours post-coïtum la membrane myocardique se comporte comme une électrode au calcium; la TTX ne modifie pas le décours du P.A., alors

que les ions Mn^{2+} suppriment l'activité spontanée en 3 minutes environ. Au 13ème jour de la gestation, la conductance rapide sodique intervient dans le développement de la phase ascendante et ce n'est qu'au 16ème jour que la perméabilité potassique retardée apparaît.

Ainsi, les modifications de perméabilité membranaire liées à la différenciation cardiaque se manifestent à des stades différents du développement du coeur chez les embryons de rat et de poulet. A cet égard, la différenciation membranaire est plus précoce chez l'embryon de poulet que chez l'embryon de rat.

Si, dès le 2ème jour de l'incubation du poulet, la perméabilité sodique rapide participe à la genèse de la phase ascendante, il en est tout autrement dans le cas du tissu myocardique différencié en culture in vitro. L'activité électrique en présence de TTX n'est pas modifiée, alors que l'administration d'ions Mn^{2+} la supprime rapidement. L'action sur l'activité électrique des milieux de perfusion hypocalciques et hyposodiques confirme l'existence au cours de la phase ascendante du P.A. d'un seul type de perméabilité; cette perméabilité de cinétique lente est calcico-sodique et le courant ionique qui en résulte semble être essentiellement calcique. L'absence des propriétés rectificatrices membranaires et l'existence d'une conductance ionique lente dans le développement du P.A. montrent que dans ces conditions de différenciation in vitro, les membranes des cardiomyoblastes n'atteignent qu'un état peu évolué. Les propriétés membranaires observées sur ce tissu pourraient correspondre à celle de l'étape initiale de la formation du tube cardiaque. On sait qu'au stade de l'apparition des contractions cardiaques, l'automatisme est de type ventriculaire. De la même façon un automatisme de type ventriculaire, sans différenciation des cellules sino-atriales, est observé dans le cas du myocarde formé in vitro à partir du mésoderme précardiaque explanté isolément.

Si par contre les conditions de culture permettent aux cellules du mésoderme précardiaque de s'organiser en une structure tubulaire creuse à parois minces, les catégories cellulaires présomptives déjà localisées à des niveaux différents de l'aire précardiaque (G. LE DOUARIN, OBRECHT et CORABOEUF, 1965, 1966) se différencient. Il est alors possible de reconnaître dans le tube cardiaque différencié in vitro

deux types de P.A. : des P.A. atriaux présentant les caractéristiques de l'automatisme et des P.A. ventriculaires de type entraîné. L'administration de TTX ou d'ions Mn^{2+} reproduit dans ce cas les modifications de l'activité électrique observées sur le coeur embryonnaire de 2 jours. Les deux modalités de l'évolution morphologique du mésoderme précardiaque obtenues expérimentalement n'aboutissent pas au même résultat sur le plan de la différenciation cellulaire. La réalisation de la morphogenèse et de l'histogenèse cardiaques permet l'acquisition d'une perméabilité de cinétique rapide. Le niveau de différenciation membranaire atteint est donc plus évolué dans le cas du tube cardiaque différencié in vitro que dans celui du tissu myocardique obtenu à partir du mésoderme précardiaque cultivé isolément.

II. Effets des catécholamines sur le tissu cardiaque embryonnaire.

Dès les stades précoces du développement (moins de 20 somites) le coeur embryonnaire de poulet est sensible à l'adrénaline et à la noradrénaline. Ce résultat implique la présence de β récepteurs adrénergiques au niveau de la membrane des cardiomyoblastes dès un stade précoce du développement, bien avant l'apparition de l'innervation cardiaque. Cette différenciation des récepteurs adrénergiques indépendante de l'innervation est confirmée par la sensibilité du tissu myocardique différencié en culture in vitro à partir du mésoderme isolé de l'aire cardiaque. L'indépendance entre la sensibilité aux catécholamines et l'innervation est en accord avec les résultats obtenus par OBRECHT-COUTRIS et CORABOEUF (1967) sur le myocarde de poulet de trois jours d'incubation.

Bien qu'une différence quantitative entre les effets de l'adrénaline et de la noradrénaline sur le rythme des contractions se manifeste en fonction du stade du développement embryonnaire, nos résultats ne montrent pas une succession de la sensibilité du myocarde d'abord à l'une de ces amines puis à l'autre. Par contre, dans le cas du myocarde ventriculaire de l'embryon de rat, BERNARD et GARGOUIL (1967b) ont montré qu'au cours de l'établissement de l'innervation cardiaque, la sensibilité aux deux catécholamines s'inversait. La noradrénaline est efficace jusqu'au 16ème jour du développement, alors que l'adrénaline est sans effet. Après ce stade, l'adrénaline produit des effets chronotropes positifs sur le coeur, alors que la noradrénaline devient inefficace.

Il convient de noter que dans le cas du tissu myocardique différencié in vitro à partir du mésoderme précardiaque de l'embryon de poulet nous avons observé, sur des préparations à rythme lent présentant des ondulations du potentiel membranaire entre les P.A., un net effet rythmogène de l'adrénaline. Compte tenu des interprétations de l'action de l'adrénaline proposées par divers auteurs (REUTER, 1968; VASSORT, CORABOEUF et GARGOUIL, 1968; VASSORT, ROUGIER, GARNIER, SAUVIAT, CORABOEUF et GARGOUIL, 1968, 1969; MIRONNEAU, LENFANT et GARGOUIL, 1969a et b) l'effet rythmogène observé sur nos préparations peut résulter d'un abaissement du seuil d'activation du canal lent calcico-sodique.

III. Présence d'une substance cholinergique dans le tissu myocardique aneural différencié in vitro.

Le mésoderme précardiaque des jeunes embryons est dépourvu d'activité cholinestérasique, mais cette activité enzymatique apparaît au cours de la différenciation en culture in vitro sur le milieu gélosé de WOLFF et HAFFEN (CREPIN et G. LE DOUARIN, 1966).

Nous avons pu montrer que le mésoderme précardiaque cultivé isolément ou au contact de feuillets épithéliaux présentait une activité cholinestérasique après 12 à 24 heures de culture. La différenciation cellulaire du mésoderme placé en culture in vitro s'accompagne donc d'une différenciation biochimique se traduisant par la synthèse de cholinestérases. Ces activités enzymatiques sont comparables à celles obtenues dans le cas des tubes cardiaques in situ au 2ème jour de l'incubation. L'apparition de l'activité cholinestérasique et, en particulier, de l'activité acétylcholinestérasique spécifique en absence de toute innervation est compatible avec l'hypothèse d'une substance cholinergique endogène qui interviendrait dans le fonctionnement automatique du myocarde aneural.

Lorsque les explants différenciés in vitro à partir du mésoderme précardiaque sont entraînés électriquement à un rythme supérieur au rythme spontané, on observe après l'arrêt de la stimulation une inhibition temporaire de l'activité. Pendant la période d'entraînement on note une diminution progressive de la pente de dépolarisation.

sation lente diastolique conduisant à sa disparition totale. A la cessation de la stimulation, cette pente retrouve progressivement sa valeur initiale, ce qui conduit à la reprise de l'activité spontanée. Le traitement préalable de la préparation par l'atropine supprime les effets inhibiteurs de la stimulation électrique à rythme rapide. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par OBRECHT, G. LE DOUARIN et CORABOEUF (1964) et par OBRECHT-COUTRIS, CORABOEUF et G. LE DOUARIN (1966) lors de l'entrafnement électrique du coeur de l'embryon de poulet prélevé avant le stade de l'innervation et placé en culture. Ces résultats sont également en accord avec ceux obtenus par HUTTER et TRAUTWEIN (1955) d'une part et DEL CASTILLO et KATZ (1955a et b) d'autre part, sur le sinus veineux de grenouille lors de la stimulation vagale. Ceci amène à penser que la libération d'acétylcholine serait responsable de l'inhibition des contractions cardiaques observée à la suite d'une stimulation directe des préparations aneures, l'atropine supprimant cette inhibition. La stimulation électrique à rythme rapide du tissu myocardique aneural provoquerait une libération de l'acétylcholine endogène, ce qui augmenterait la perméabilité potassique (HARRIS et HUTTER, 1956; HUTTER et TRAUTWEIN, 1956; TRAUTWEIN et DUDEL, 1968; HUTTER et NOBLE, 1960; NOBLE, 1960, 1962; ...). L'accroissement de la conductance potassique produirait la diminution de la vitesse de la pente de dépolarisation lente diastolique. Lorsque l'effet de l'acétylcholine s'estompe, ce que l'existence des activités cholinestérasiques dans le tissu peut expliquer, la perméabilité potassique revient progressivement à sa valeur initiale et la pente de dépolarisation diastolique retrouve sa vitesse normale.

L'analyse de la différenciation cardiaque chez l'embryon des Vertébrés supérieurs, qui est poursuivie par plusieurs Laboratoires sous l'angle des propriétés membranaires met en relief l'existence de stades particuliers où se produisent d'importants changements. Il en est ainsi, par exemple, de l'apparition d'un canal sodique rapide participant à l'électrogenèse cellulaire. Le déterminisme de tels changements est encore hypothétique. Dans l'exemple qui vient d'être cité, l'établissement de l'innervation cardiaque ne semble pas être, chez l'embryon de poulet, le facteur qui provoque cette différenciation membranaire. La chronologie des événements qui se

situent au niveau de la membrane des cardiomyoblastes apparaît être différente chez les embryons de rat et de poulet, dans le sens d'une plus grande précocité chez ce dernier.

Les mécanismes impliqués dans la différenciation des membranes cellulaires du myocarde semblent constituer un domaine de recherche susceptible d'apporter d'utiles renseignements. A cet égard, les techniques actuelles de l'étude morphologique et biochimique des membranes, permettant dans des cas favorables la visualisation de structures spécialisées telles que des récepteurs, paraissent très prometteuses. Par ailleurs, il convient également de se demander dans quelle mesure il est possible d'établir des corrélations entre l'acquisition de structures membranaires spécialisées responsables des propriétés fonctionnelles et la programmation des synthèses protéiques contenue dans les cellules embryonnaires en voie de différenciation. De telles recherches, qui peuvent être envisagées pour le proche avenir, impliqueront l'utilisation des méthodes de l'Embryologie et bénéficieront des techniques électrophysiologiques qui permettent de définir des critères précis de caractérisation des étapes fonctionnelles de la différenciation.

R E S U M E

Le travail faisant l'objet de ce mémoire concerne les aspects électrophysiologiques de la différenciation cardiaque chez l'embryon de poulet.

1 - La différenciation en culture in vitro du mésoderme précardiaque isolé aboutit à la formation d'un amas compact de tissu myocardique dépourvu de cavité centrale. Tous les potentiels d'action enregistrés dans ce type d'explant sont de nature ventriculaire. Après quelques jours de culture, l'automatisme, qui demeure de type ventriculaire, se généralise à l'ensemble de l'explant.

2 - Le maintien des contacts tissulaires du mésoderme précardiaque avec les autres feuillets de l'aire cardiaque permet la formation, en culture in vitro, d'un tube cardiaque dans lequel les cellules ventriculaires et sino-atriales se différencient. Il apparaît donc qu'il existe un antagonisme entre la prolifération cellulaire, favorisée lorsque le mésoderme précardiaque est cultivé isolément et la différenciation des catégories cellulaires qui se produit lorsque s'organise un tissu cardiaque à paroi mince. L'action des feuillets épithéliaux de l'aire précardiaque sur le mésoderme n'est pas spécifique, car des lambeaux épithéliaux de diverses origines favorisent la formation d'une structure tubulaire cardiaque.

3 - Au cours de l'ontogenèse normale, la sensibilité aux catécholamines de l'ébauche cardiaque existe très tôt, bien avant l'établissement de l'innervation du coeur. Egalement, la sensibilité à l'adrénaline a pu être mise en évidence dans le cas du tissu myocardique aneural différencié en culture in vitro.

4 - Une inhibition post-stimulative fait suite à une période d'entraînement électrique à rythme rapide du myocarde aneural différencié in vitro. Cette inhibition est supprimée par l'atropine. Ces observations, ainsi que la présence dans le tissu

d'activités cholinestérasiques, conduisent à admettre l'existence d'une substance cholinergique endogène comme cela a été montré sur le coeur embryonnaire normal à un stade antérieur à l'établissement de l'innervation.

5 - L'utilisation de déséquilibres ioniques, d'inhibiteur de perméabilités ioniques membranaires et l'application de courants imposés transmembranaires ont permis de mettre en évidence une évolution, au cours de la différenciation cardiaque, des perméabilités ioniques responsables de l'électrogenèse cellulaire.

Le potentiel de repos est, dès le deuxième jour de l'incubation, dû essentiellement à une perméabilité potassique. Sa valeur augmente au cours des premiers jours du développement. Cependant, les propriétés rectificatrices de la membrane des cardiomyoblastes ne s'établissent qu'après le stade de 2 jours d'incubation.

Aux stades initiaux du développement, jusqu'à 30 somites environ, la phase ascendante du potentiel d'action résulte d'un flux ionique entrant assuré par deux types de perméabilité: le canal rapide sodique et le canal lent calcico-sodique. Le fonctionnement d'un seul de ces canaux, l'autre étant expérimentalement inhibé, suffit à assurer une activité électrique propagée. Par contre, à des stades plus évolués - après celui de 40 somites - le fonctionnement du canal rapide est strictement indispensable. Ce changement dans les propriétés membranaires des cardiomyoblastes se produit donc, chez l'embryon de poulet, avant que ne s'établisse l'innervation cardiaque. Les modifications essentielles que nous avons observées ont lieu au cours d'une période de développement relativement brève: du stade de 30 somites à celui de 40 somites. Toutefois une évolution progressive de certaines perméabilités membranaires a également été mise en évidence. Il en est ainsi du canal lent calcico-sodique, dont le seuil d'activation s'élève au cours du développement embryonnaire.

6 - Les cellules du tissu myocardique différencié in vitro à partir du mésoderme précardiaque isolé possèdent des perméabilités ioniques de type très primitif: seul le canal lent calcico-sodique existe et assume l'activité électrique. Par contre, dans le cas du tube cardiaque obtenu par l'explantation de l'aire précardiaque totale,

les mécanismes ioniques de l'électrogenèse sont identiques à ceux qui ont été mis en évidence au stade de deux jours d'incubation dans le développement normal. Il existe ainsi une corrélation entre la réalisation des étapes initiales de l'histogenèse cardiaque et un degré de différenciation des membranes des cardiomyoblastes, qui n'est pas atteint lorsque le mésoderme précardiaque, bien que formant du tissu myocardique spontanément contractile, ne s'organise pas en tube cardiaque.

B I B L I O G R A P H I E

- ABEL, W. - 1912 - Further observations on the development of the sympathetic nervous system in the chick. *J. Anat. Physiol.*, 47, 35-72. In: ROMANOFF, 1960.
- ANALIS, J. et BENITEZ, D. - 1967 - The decrease in the automatism of the Purkinje pacemaker fibers provoked by high frequencies of stimulation. *Jap. J. Physiol.*, 17, 556-571.
- ARMSTRONG, P.B. - 1935 - The role of the nerves in the action of acetylcholine on the embryonic heart. *J. Physiol.*, London, 84, 20-32.
- AUGUSTINSSON, K.B., FÄNGE, R., JOHNELS, A. et ÖSTLUND, E. - 1956 - Histological, physiological and biochemical studies on the heart of two Cyclostomes, Hag fish (*Myxina*) and Lamprey (*Lampetra*). *J. Physiol.*, London, 131, 257-276.
- BACON, R.L. - 1945 - Self differentiation and induction in the heart of *Amblystoma*. *J. Exp. Zool.*, 98, 87-125.
- BAKER, J.R. - 1944 - The structure and the chemical composition of the Golgi element. I. Techniques. *Quart. J. Micr. Sc.*, 85, 1-71.
- BAKER, P.F., BLAUSTEIN, M.D., HODGKIN, A.L. et STEINHARDT, R.A. - 1969 - The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J. Physiol.*, London, 200, 431-458.
- BARRY, A. - 1942 - The intrinsic pulsation rates of fragments on the embryonic chick heart. *J. Exptl. Biol.*, 91, 119-130.
- BARRY, A. - 1950 - The effect of epinephrine on the myocardium of the embryonic chick. *Circulation*, 1, 1362-1368.
- BEELEER, G.W. et REUTER, H. - 1970 a - Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres. *J. Physiol.*, London, 207, 191-209.
- BEELEER, G.W. et REUTER, H. - 1970 b - The relation between membrane potential, membrane currents and activation of contraction in ventricular myocardial fibres. *J. Physiol.*, London, 207, 211-229.

- BERGMAN, C. - 1969 - Seuil d'excitation et régimes d'activité du noeud de Ranvier.
Thèse ès-Sciences, Orsay.
- BERGMAN, R.A. - 1962 - Observations on the morphogenesis of rat skeletal muscle.
Bull. Johns Hopk. Hosp., 110, 187-201.
- BERNARD, Cl. - 1970 a - Etude électrophysiologique des réponses myocardiques chez l'embryon de Rat. Acquisitions successives des perméabilités caractéristiques de la membrane cardiaque. Thèse ès-Sciences, Poitiers.
- BERNARD, Cl. et GARGOUÏL, Y.M. - 1963 - Evolution de la repolarisation du myocarde ventriculaire chez le fœtus de Rat. C.R. Acad. Sci., 256, 4972-4974.
- BERNARD, Cl. et GARGOUÏL, Y.M. - 1967 a - Etude électrophysiologique de la sensibilité aux catécholamines du cœur de Rat lors de la croissance embryonnaire. C.R. Soc. Biol., 161, 2600-2605.
- BERNARD, Cl. et GARGOUÏL, Y.M. - 1968 a - Les perméabilités de la membrane myocardique embryonnaire de Rat; étude de leurs évolutions au cours de l'embryogenèse à l'aide d'inhibiteurs: tétrodotoxine, manganèse, tétraéthylammonium. C.R. Acad. Sci., 267, 1626-1629.
- BERNARD, Cl. et GARGOUÏL, Y.M. - 1970 b - Acquisitions successives, chez l'embryon de Rat, des perméabilités spécifiques de la membrane myocardique. C.R. Acad. Sci., 270, 1495-1498.
- BERNARD, Cl., GARGOUÏL, Y.M., ROUGIER, O., RAYMOND, G. et GARNIER, D. - 1968 b - La réponse et les courants transmembranaires de la fibre auriculaire cardiaque d'Axolotl; existence d'un canal rapide insensible à la tétrodotoxine, présence d'un canal lent. J. Physiol., Paris, 60, 346.
- BERNARD, Cl., PAGER, J. et GARGOUÏL, Y.M. - 1967 b - Sensibilité du cœur embryonnaire de Rat à l'adrénaline et la noradrénaline. J. Physiol., Paris, 59, 350-351.
- BERNARD, Cl., RAYMOND, G. GROS, D. et GARGOUÏL, Y.M. - 1968 c - Etude de la perméabilité membranaire du myocarde de l'embryon de Rat, à l'aide de quelques inhibiteurs spécifiques. J. Physiol., Paris, 60, 216.
- BERNARD, Cl., RAYMOND, G. GROS, D. et GARGOUÏL, Y.M. - 1969 - Réponses électriques et contractions initiales du myocarde embryonnaire de Rat: présence d'un canal de cinétique lente. J. Physiol., Paris, 61, 216.
- BERSTEIN, J. - 1902 - Untersuchungen zur thermodynamik der bioelektrischen Ströme. Pflugers Arch., 92, 521-562.

- BERNSTEIN, J. - 1912 - Elektrobiologie; die Lehre von den elektrischen Vorgängen im Organismus auf moderner Grundlage dargestellt. Braunschweig, F. Vieweg und Sohn.
- BESSEAU, A. - 1971 - Analyse, selon le modèle de Hodgkin et Huxley, des conductances de la membrane myocardique de grenouille (Rana esculenta). Thèse ès-Sciences, Poitiers.
- BESSEAU, A., GARGOUIL, Y.M. et BERNARD, Cl. - 1972 - Conductances in frog myocardial fibres. Graphic and computed analysis according to the Hodgkin - Huxley equations. Proc. IV Int. Biophys. Congr., Moscou.
- BESSEAU, A., LENFANT, J. et MIRONNEAU, J. - 1971 - Etude comparée des effets inhibiteurs du manganèse et du lanthane sur le courant lent des membranes myocardiques. J. Physiol., Paris, 63, suppl. 2, 13A - 14A.
- BLOOM, G. et OSTLUND, E. - 1961 - Studies on catecholamines containing granules of specific cells in Cyclostomes hearts. Acta physiol. Scand., 53, suppl. 185, 1-34.
- BLOOM, G., OSTLUND, E. et EULER Von, U.S. - 1962 - A specific granular secretory cell in the heart of Cyclostomes. Mem. Soc. Endocr., 12, 255-263.
- BORGHGRAEF, R. et CARMELIET, E. - 1957 - Etude électrophysiologique du myocarde d'amphibien en absence de potassium et sous l'influence de l'acétylcholine. C.R. Soc. Biol., 151, 1779-1781.
- BRADY, A.J. - 1964 - Physiology of the amphibian heart. In: J.A. MOORE : Physiology of Amphibia. Academic Press, New-York, 211-246.
- BRADY, A.J. et TAN, S. T. - 1966 - The ionic dependence of cardiac excitability and contractility. J. Gen. Physiol., 49, 781-791.
- BRADY, A.J. et WOODBURY, J.W. - 1956 - Effects of stimulus rate and external ion concentration on ventricular transmembrane potentials. Amer. J. Physiol., 187, 588.
- BRADY, A.J. et WOODBURY, L.A. - 1960 - The sodium potassium hypothesis as the basis of electrical activity in frog ventricle. J. Physiol., London, 154, 385-407.
- BRIDE, M. - 1965 - Aspects morphologiques, histologiques et fonctionnels du cœur embryonnaire de grenouille, en culture in vitro. Ann. Scient. Univ. Besançon, 43, Zool. et Physiol., fasc. 1, 39-48.
- BRIDE, M. - 1971 - Activité électrique transmembranaire du cœur embryonnaire d'Amphibiens Anoures in vivo et in vitro. C.R. Acad. Sci., 273, 1415-1418.

- BRIDE, M. et GOMOT, L. - 1967 - Différenciation in vivo et en culture in vitro de l'ébauche cardiaque primitive ou pulsatile de Rana temporaria L. C.R. Soc. Biol., 161, 1062-1067.
- BRISCOE, S.M. et BURN, J.H. - 1954 - The formation of an acetylcholine like substance by the isolated rabbit heart. J. Physiol., London, 126, 181-190.
- BROOKS, C. Mc. C., HOFFMAN, B.F., SUCKLING, E.E. et ORIAS, O. - 1955 - Excitability of the heart. Grune et Stratton, N.Y. et Lond.
- BROWN, G. et ECCLES, J.C. - 1934 - The action of a single vagal volley on the rythm of the heart beat. J. Physiol., London, 82, 211-240.
- BROWN, H.J. et NOBLE, D. - 1969 - Membrane current underlying delayed rectification and pace-maker activity in frog atrial muscle. J. Physiol., London, 204, 717-736.
- BRUNO, G. - 1918 - Monit. Zool. ital., 29, 53-64.
- BURDON-SANDERSON, J. et PAGE, F.J.M. - 1880 - On the time relation of the excitatory process in the ventricle of the heart of the frog. J. Physiol., London, 108, 508-524. In: CORABOEUF, 1960.
- BURDON-SANDERSON, J. et PAGE, F.J.M. - 1883 - On the electrical phenomena of the excitatory process in the heart of the frog and of the tortoise, as investigated photographically. J. Physiol., London, 4, 327-338. In: CORABOEUF, 1960.
- BURGEN, A.S. et TERROUX, K.G. - 1953 - On the negative inotropic effect in cat's auricle. J. Physiol., London, 120, 449-464.
- BURNIER, J. - 1935 - Action de l'acétylcholine sur l'embryon de poulet avant et après l'apparition du système nerveux. C.R. Soc. Biol., 118, 1032-1033.
- BUTLER, E. - 1935 - The developmental capacity of regions of inincubated chick blastoderm as tested in chorio-allantoic grafts. J. Experiment. Zool., 70, 357-389.
- CARAVITA, S. et COCCIA, L. - 1966 - Les cellules chromaffines du coeur de la Lamproie (Lampetra zanandreae). Etude au microscope électronique avant et après un traitement à la réserpine. Arch. Biol., Liège, 77, 723-753.
- CARAVITA, S. et GIBERTINI, G. - 1966 - Osservazioni sull' ultrastruttura del cuore di embrione di pollo durante la miogenesi. Arch. ital. Anat. Embriol., 71, 49-68.
- CARMELIET, E. - 1960 - Influence de la concentration extracellulaire du K sur la perméabilité de la membrane des fibres de Purkinje de Mouton pour les ions ⁴²K. Helv. physiol. pharmacol. Acta, 18, C15-C16.

- CARMELIET, E. - 1961 a - Chloride and potassium permeability in cardiac Purkinje fibres. Thèse. Ed. Arscia, S.A., Bruxelles, Press. Acad. Europ.
- CARMELIET, E. - 1961 b - Chloride ions and membrane potential of Purkinje fibres. J. Physiol., London, 156, 375-388.
- CARMELIET, E. et VEREECKE, J. - 1969 - Adrenaline and the plateau phase of the cardiac action potential. Pflügers Arch., 313, 300-315.
- CHANG, J.J. et SCHMIDT, R.F. - 1960 - Prolonged action potentials and regenerative hyperpolarizing response in Purkinje fibres of mammalian heart. Pflügers Arch., 272, 127-141.
- CHESNAIS, J.M., CORABOEUF, E., SAUVIAT, M.P. et VASSAS, J.M. - 1971 - Action des ions magnésium sur les courants transmembranaires des fibres atriales de grenouille. J. Physiol., Paris, 63, 188A.
- CHESSICK, R.D. - 1954 - The histochemical specificity of cholinesterases. J. Histochem. Cytochem., 2, 258-273.
- CHIANG, T.S. et LEADERS, F.E. - 1966 - Cardiostimulatory responses to vagal stimulation, nicotine and tyramine. Amer. J. Physiol., 211, 1443-1446.
- CLUZET, A. et SARVONNAT, P. - 1914 - L'électrocardiogramme de l'embryon de Poulet. J. Physiol. Path. gen., 16, 802-808.
- CONWAY, E.J. - 1957 - Nature and significance of concentration relations of potassium and sodium ions in skeletal muscle. Physiol. Rev., 37, 84-132.
- CORABOEUF, E. - 1960 - Aspects cellulaires de l'électrogenèse cardiaque chez les Vertébrés. J. Physiol., Paris, 52, 323-417.
- CORABOEUF, E. - 1970 - In: Physiologie Ch. KAYSER, III, 309-344.
- CORABOEUF, E. - 1971 a - Courants ioniques transmembranaires dans les cellules cardiaques: applications à la pharmacologie. Actual. Pharmacol., 24, 153-182.
- CORABOEUF, E. - 1971 b - Membrane ionic permeabilities and contractile phenomena in myocardium. Cardiovasc. Res., suppl. 1, 55-63.
- CORABOEUF, E. et BOISTEL, J. - 1953 - L'action des taux élevés de gaz carbonique sur le tissu cardiaque, étudiée à l'aide de microélectrodes intracellulaires. C.R. Soc. Biol., 147, 654-658.
- CORABOEUF, E., BOISTEL, J. et DISTEL, R. - 1955 - Les différentes modalités de l'activité électrique du tissu conducteur du coeur de Mammifères. C.R. Soc. Biol., 149, 1138-1142.

- CORABOEUF, E., GALAND, G., WALLON, G. et GARGOUÏL, Y.M. - 1959 - Effets des milieux hyposodiques sur l'activité électrique du coeur de Mammifère isolé. C.R. Soc. Biol., 153, 1837-1841.
- CORABOEUF, E., GARGOUÏL, Y.M., LAPLAUD, J. et DESPLACES, A. - 1958 - Action de l'anoxie sur les potentiels électriques des cellules cardiaques de Mammifères actives et inertes (tissu ventriculaire isolé de Cobaye). C.R. Acad. Sci., 246, 3100-3103.
- CORABOEUF, E. et GARNIER, D. - 1960 - Action de l'acétylcholine sur le coeur isolé de cobaye soumis à des milieux privés de calcium et de magnésium. C.R. Soc. Biol., 154, 1601.
- CORABOEUF, E. et GARNIER, D. - 1961 - Action des milieux privés de Ca^{++} et de Mg^{++} sur l'activité électrique et mécanique du coeur isolé de Rat et de Cobaye. J. Physiol., Paris, 53, 304-306.
- CORABOEUF, E., GARNIER, D., BLET, G. et GARGOUÏL, Y.M. - 1960 - Action du dinitro-phénol au niveau de la fibre ventriculaire de coeur de Mammifères. C.R. Soc. Biol., 154, 1038-1041.
- CORABOEUF, E. et GUILBAULT, P. - 1960 - Action comparée de milieux hyposodiques sur les coeurs isolés de rat et de cobaye. C.R. Soc. Biol., 154, 1053-1056.
- CORABOEUF, E., GUILBAULT, P., BRETON, D. et DUMONT, M. - 1961 - Action des milieux hypopotassiques sur l'activité électrique et mécanique du coeur isolé de Rat et de Cobaye. J. Physiol., Paris, 53, 306-307.
- CORABOEUF, E., KAYSER, C. et GARGOUÏL, Y.M. - 1956 a - Enregistrement parallèle de l'électrocardiogramme externe et de l'activité électrique d'une fibre myocardique unique chez trois Mammifères. C.R. Acad. Sci., 243, 1444-1447.
- CORABOEUF, E., KAYSER, C. et GARGOUÏL, Y.M. - 1956 b - La repolarisation du myocarde au cours de l'hypothermie chez trois espèces de Mammifères: Cobaye, Spermophile et Rat blanc. C.R. Acad. Sci., 143, 1673-1676.
- CORABOEUF, E., LE DOUARIN, G. et OBRECHT, G. - 1965 - Morphologie de l'activité électrique transmembranaire du coeur embryonnaire de Poulet en culture organotypique. C.R. Soc. Biol., 159, 110-114.
- CORABOEUF, E., LE DOUARIN, G. et OBRECHT-COUTRIS, G. - 1970 a - Release of acetylcholine by chick embryo heart before innervation. J. Physiol., London, 206, 383-395.

- CORABOEUF, E., OBRECHT-COUTRIS, G. et LE DOUARIN, G. - 1970 b - Acetylcholine and the embryonic heart. *Amer. J. Cardiol.*, 25, 285-291.
- CORABOEUF, E. et OTSUKA, M. - 1956 - L'action des solutions hyposodiques sur les potentiels cellulaires de tissu cardiaque de Mammifères. *C.R. Acad. Sci.*, 243, 441-444.
- CORABOEUF, E. et VASSORT, G. - 1967 - Effets de la tétródotoxine, du tétraéthylammonium et du manganèse sur l'activité du myocarde de Rat et de Cobaye. *C.R. Acad. Sci.*, 264, 1072-1075.
- CORABOEUF, E. et VASSORT, G. - 1968 - Effects of some inhibitors of Ionic Permeabilities on Ventricular Action Potential and Contraction of Rat and Guinea-Pig Hearts. *J. Electrocardiology*, 1, 19-30.
- CORABOEUF, E. et WEIDMANN, S. - 1949 a - Potentiel de repos et potentiel d'action du muscle cardiaque mesurés à l'aide d'électrodes intracellulaires. *C.R. Soc. Biol.*, 143, 1329-1331.
- CORABOEUF, E. et WEIDMANN, S. - 1949 b - Potentiels d'action du muscle cardiaque obtenus à l'aide de microélectrodes intracellulaires. Présence d'une inversion de potentiel. *C.R. Soc. Biol.*, 143, 1360-1361.
- CORABOEUF, E., ZACOUTO, F., GARGOUIL, Y.M. et LAPLAUD, J. - 1958 - Mesure de la résistance membranaire du myocarde ventriculaire de Mammifères au cours de l'activité. *C.R. Acad. Sci.*, 246, 2934-2937.
- COUTEAUX, R. et LAURENT, P. - 1957 - Etude au microscope électronique du coeur de l'anguille: observations sur la structure du tissu musculaire de l'oreillette et son innervation. *C.R. Acad. Sci.*, 245, 2097-2100.
- CRANEFIELD, P.F., EYSTER, J.A.E. et GILSON, W.E. - 1951 - Effect of reduction of external sodium chloride on the injury potentials of cardiac muscle. *Amer. J. Physiol.*, 166, 269-272.
- CREPIN, M. - 1966 - Etude biochimique et histochimique de l'activité cholinestérasique du tissu myocardique au cours de la différenciation cardiaque chez l'embryon de poulet. D.E.S. Nantes, Faculté des Sciences.
- CREPIN, M. et LE GOUARIN, G. - 1966 - Activités cholinestérasiques du tissu cardiaque différencié in vitro par le mésenchyme de l'aire cardiaque de l'embryon de poulet. *C.R. Acad. Sci.*, 263, 1479-1481.

- CRILL, W.E., RUMERY, R.E. et WOODBURY, J.W. - 1959 - Effects of membrane current on transmembrane potentials of cultured chick embryo heart cells. *Amer. J. Physiol.*, 197, 733-735.
- CURTIS, H.J. et COLE, K.S. - 1940 - Membrane action potentials from the Squid giant axon. *J. Cell. compar. Physiol.*, 15, 147-157.
- CURTIS, H.J. et COLE, K.S. - 1942 - Membrane resting and action potentials from the Squid giant axon. *J. Cell compar. Physiol.*, 19, 135-144.
- DAY, M. - 1956 - The release of substances like acetylcholine and adrenaline by the isolated rabbit heart. *J. Physiol., London*, 134, 558-568.
- DECK, K.A. et TRAUTWEIN, W. - 1964 - Ionic currents in cardiac excitation. *Pflügers Arch.*, 290, 63-80.
- DE HAAN, R.L. - 1963 - Regional organization of pre-pacemaker cells in the cardiac primordia of the early chick embryo. *J. Embryol. Exptl. Morphol.*, 11, 65-76.
- DE HAAN, R.L. - 1964 - Cell interactions and oriented movements during development. *J. Exp. Zool.*, 157, 127-138.
- DE HAAN, R.L. - 1967 - Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture. *Dev. Biol.*, 16, 216-249.
- DE HAAN, R.L. - 1970 - The potassium sensitivity of isolated embryonic heart cells increases with development. *Dev. Biol.*, 23, 226-240.
- DE HAAN, R.L. et GOTTLIEB, S. - 1968 - The electrical activity of embryonic chick heart cells isolated in tissue culture singly or in interconnected cell sheets. *J. gen. Physiol.*, 52, 643-665.
- DEL CASTILLO, J. et KATZ, B. - 1955 a - Effect of vagal and sympathetic nerve impulses on the membrane potential of the frog's heart. *J. Physiol., London*, 129, 48-49.
- DEL CASTILLO, J. et KATZ, B. - 1955 b - Modifications de la membrane produites par des influx nerveux dans la région du pace-maker du coeur. *Colloques Int. Microphysiol., C.N.R.S., Paris*, 271-278.
- DRAPER, M.H. et WEIDMANN, S. - 1951 - Cardiac resting and action potentials recorded with an intracellular electrode. *J. Physiol., London*, 115, 74-94.
- DUDEL, J., PEPPER, K., RÜDEL, R. et TRAUTWEIN, W. - 1967 - The effect of tetrodotoxin on the membrane current in cardiac muscle (Purkinje fibres). *Pflügers Arch.*, 295, 215-227.

- DUDEL, J. et TRAUTWEIN, W. - 1958 - Der Mechanismus der automatischen rhythmischen Impulsbildung der Herzmuskelfaser. *Pflügers Arch.*, 267, 553-656.
- EBERT, J.D. - 1950 - An analysis of the effects of anti-organ sera on the development in vitro of the early chick blastoderm. *J. Experiment. Zool.*, 115, 351-378.
- EBERT, J.D. - 1959 - The formation of muscle and muscle-like elements in the chorio-allantoic membrane following inoculation of a mixture of cardiac microsomes and Rous sarcoma virus. *J. Experiment. Zool.*, 142, 587-613.
- EBERT, J.D., TOLMAN, R.A., MUN, A.M. et ALBRIGHT, J.F. - 1955 - Pattern of synthesis in differentiation; the molecular basis of the first heart beats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 60, 968-985.
- EDWARDS, C. et HARRIS, E.J. - 1957 - Factors influencing the sodium movement in frog muscle with a discussion of the mechanism of sodium movement. *J. Physiol.*, London, 135, 567-580.
- EKMAN, G. - 1921 - Experimentelle Beiträge zur Entwicklung des Bombinator Herzens. *Oversikt Finska Vetenskaps Societ. Förhandl.*, 63, 1-37.
- EKMAN, G. - 1925 - Experimentelle Beiträge zur Herzentwicklung der Amphibien. *Roux' Arch. Entw. Mech.*, 106, 320-352.
- ENGSTFELD, G., ANTONI, H. et FLECKENSTEIN, A. - 1961 - Die Restitution der Erregungsfortleitung und Kontraktionskraft des K^+ gelähmten Frosch und Säugetiermyokards durch Adrenalin. *Pflügers Arch.*, 273, 145-163.
- ENIKEEVA, S.I. - 1954 - The nervous regulation of the cardiac activity in animals and man at different age periods. *Transactions of the first scientific conference on Age Morphology and Physiology*. (Izd. Akad. Fed. Nank, R. SFSR Moscou).
- ENGELMANN, T.H.W., NUEL, R. et PEKELHARING, H.J. - 1873 - Over de elektromotorische Verschijnselen van het hart. *Proc. Verb. d. Köninkl. Ned. Akad. d. Wetenschap. Amsterdam*, 28 Juin, 2-3. In: "WEIDMANN'S - 1960".
- FABIATO, A. - 1970 - Désynchronisation et resynchronisation dans le syncytium fonctionnel myocardique: aspects électrophysiologiques et mécaniques. *Thèse ès-Sciences*, Orsay.
- FÄNGE, R. et ÖSTLUND, E. - 1954 - The effect of adrenaline, noradrenaline, tyramine and other drugs on the isolated heart from marine vertebrates and a cephalopod. (Eledone cirrosa). *Acta Zool.*, 35, 289-305.

- FÄNGE, R., PERSSON, H. et THESLEFF, S. - 1957 - Electrophysiologic and pharmacological observations on trypsin desintegrated embryonic chick hearts cultured in vitro. *Acta Physiol. Scand.*, 38, 173-183.
- FATT, P. et GINSBORG, B.C. - 1958 - The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres. *J. Physiol.*, London, 142, 516-543.
- FINGL, E., WOODBURY, L.A. et HECHT, H.H. - 1952 - Effects of innervation and drugs upon direct membrane potentials of embryonic chick myocardium. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 104, 103-114.
- FREYGANG, W.H. Jr. et ADRIAN, R.H. - 1961 - Potassium movement in muscle membrane. Anomalous rectification. In: "Biophysics of Physiological and Pharmacological Actions", Ed. Shanes, Washington A.A.A.S., 245-257.
- FUJII, M. - 1927 - Effects of drugs on embryonic chicken heart in various stages of its development. *Folia Pharmacol. Japon*, 4, 412-425.
- FURCHGOTT, R.F. - 1967 - The pharmacological differentiation of adrenergic receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 139, 553-570.
- GARNIER, D. - 1968 - Analyse électrophysiologique des propriétés de la membrane cellulaire cardiaque en absence d'ions bivalents: interprétation du plateau des réponses myocardiques. Thèse ès-Sciences, Poitiers.
- GARNIER, D. et CORABOEUF, E. - 1964 - Activité électrique et mécanique du coeur isolé de rat et de cobaye, action de l'adrénaline en milieu normal et privé de calcium et de magnésium. *C.R. Soc. Biol.*, 158, 799-805.
- GARNIER, D. et ROUGIER, O. - 1968 - Analyse électrophysiologique des propriétés de la membrane en absence d'ions bivalents: interprétation du plateau de la réponse myocardique. *J. Physiol.*, Paris, 60, suppl. 2, 446.
- GARNIER, D. et ROUGIER, O. - 1969 - Action de l'acétylcholine et du chlorure de tétraéthylammonium sur les courants transmembranaires des cellules myocardiques. In: "Médicaments et métabolisme du myocarde et du muscle strié". Symposium intern., Nancy, 333-334.
- GARNIER, D., ROUGIER, O., GARGOUIL, Y.M. et CORABOEUF, E. - 1969 - Analyse électrophysiologique du plateau des réponses myocardiques, mise en évidence d'un courant lent entrant d'ions bivalents. *Pflügers Arch.*, 313, 321-342.

- GARGOUÏL, Y.M. - 1958 - Relations entre l'activité électrique cellulaire et globale du coeur et certains aspects de son métabolisme. Thèse ès-Sciences, Poitiers.
- GARGOUÏL, Y.M. - 1969 - Intérêt des méthodes électrophysiologiques pour l'étude, à l'échelle de la cellule, des propriétés et des modalités d'action des substances pharmacologiques. Rev. Fr. Pharmacie, 13, 51-63.
- GARGOUÏL, Y.M. et CORABOEUF, E. - 1957 - Enregistrement intracellulaire de l'activité électrique du ventricule de roussette Scyliorhinus Canicula Linné). C.R. Acad. Sci., 245, 1949-1952.
- GARGOUÏL, Y.M., CORABOEUF, E., DUBOIS, M. et STRUDEL, N. - 1958 - Comparaison des électrogrammes cardiaques chez la Lapine gravide et le fœtus (électrogrammes intracellulaires et EEG). Bull. Acad. Nat. Med., 23, 644-647.
- GARGOUÏL, Y.M., CORABOEUF, E., THIBAULT, E., HESSE, O., WALLON, O. et STRUDEL, N. - 1958 - Rôle de la thyroïde dans l'électrogenèse cardiaque chez le Mammifère. C.R. Soc. Biol., 152, 1083-1085.
- GARGOUÏL, Y.M., CORABOEUF, E., TRICOCHÉ, R. et WALLON, G. - 1959 - Evolution des électrogrammes cardiaques chez le Rat au cours de la croissance. C.R. Soc. Biol., 153, 450-454.
- GARGOUÏL, Y.M., LEOTY, Cl., POINDESSAULT, J.P. et RAYMOND, G. - 1969 - Evolution du courant initial global et de la contraction sur la fibre sinoauriculaire de Grenouille. C.R. Acad. Sci., 269, 1686-1689.
- GARGOUÏL, Y.M., TRICOCHÉ, R. et BERNARD, Cl. - 1963 - Evolution, au cours de l'activité, de la résistance membranaire du myocarde ventriculaire. Utilisation de deux microélectrodes jumelées. C.R. Acad. Sci., 257, 1801-1803.
- GARGOUÏL, Y.M., TRICOCHÉ, R., FROMENTY, D. et CORABOEUF, E. - 1958 - Effets de l'adrénaline sur l'activité électrique du coeur de Mammifère. C.R. Acad. Sci., 246, 334-336.
- GARREY, W.E. - 1937 - Action of acetylcholine on cultures of chick heart. Amer. J. Physiol., 119, 314.
- GARREY, W.E. et CHASTAIN, L.L. - 1937 - Acetylcholine action on the turtle heart. Amer. J. Physiol., 119, 314-315.

- GARREY, W.E. et TOWNSEND, S.E. - 1948 - Neural responses and reactions on the heart of a human embryo. - J. Physiol., London, 4, 43-127.
- GASKELL, W.H. - 1883 - On the innervation of the heart with especial reference to the heart of the tortoise. J. Physiol., London, 4, 43.
- GEREBTZOFF, M.A. - 1953 - Recherches histochimiques sur les acétylcholines et cholinestérases. I. Introduction et technique. Acta Anat., 19, 366-379.
- GEREBTZOFF, M.A. - 1956 - Recherches sur l'innervation cholinergique comparée du coeur des Mammifères et de tortue. Ann. Histoch., 1, 166-175.
- GETTES, L.S., SURAWICZ, B. et SHIUE, J.C. - 1962 - Effect of high K, low K and quinidine on QRS duration and ventricular action potential. J. Physiol., London, 203, 1135-1140.
- GOODMAN, F.R. et WEISS, G.B. - 1971 - Dissociation by lanthanum of smooth muscle responses to potassium and acetylcholine. Amer. J. Physiol., 220, 759-766.
- GOSSWEILLER, N., KIPPER, K., PORETTI, G. et RUMMEL, W. - 1954 - Der Einfluss von Calcium auf dem Kalium-Austritt aus Muskelgewebe. Pflügers Arch., 260, 154-160.
- GROS, D. et SCHREVEL, J. - 1970 - Ultrastructure comparée du muscle cardiaque ventriculaire de l'Amblystome et de sa larve, l'Axolotl. - J. Microsc., 9, 765-784.
- GUELIN-SCHEDRINA, A. - 1936 - Réactions aux excitations du coeur de l'embryon de poulet au stade de 48 heures. C.R. Soc. Biol., 121, 211-214.
- GUILBAULT, P. - 1966 - Action des ions sur l'activité électrique et l'activité mécanique du coeur de Mammifère. Thèse ès-Sciences, Orsay.
- GUILBAULT, P., CORABOEUF, E., GARNIER, D. et PADEL, Y. - 1962 - Action comparée des milieux hypocalciques et hypercalciques sur le coeur isolé de Rat et de Cobaye. C.R. Soc. Biol., 156, 1055-1060.
- GOMEZ, H. - 1958 - The development of the innervation of the heart in the rat embryo. Anat. Rec., 130, 53-71.
- HAAS, H.G. et KERN, R. - 1969 - Na inactivation and reactivation in cardiac muscle. Pflügers Arch., 312, 28.
- HAAS, H.G., KERN, R., EINWÄCHTER, H.M. et TARR, M. - 1971 - Kinetics of Na inactivation in Frog atria. Pflügers Arch., 323, 141-157.

- HAGIWARA, S. et NAKAJIMA, S. - 1965 - Tetrodotoxin and manganese ion: effects on action potential of the frog heart. *Science*, 149, 1254-1255.
- HAGIWARA, S. et NAKAJIMA, S. - 1966 - Differences in Na and Ca spikes as examined by application of tetrodotoxin, procaine and manganese ions. *J. Gen. Physiol.*, 49, 793-806.
- HAGIWARA, S. et TAKAHASHI, K. - 1967 - Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane. *J. Gen. Physiol.*, 50, 583-601.
- HAJDU, S. - 1953 - Mechanism of staircase and contracture in ventricular muscle. *Amer. J. Physiol.*, 174, 371-380.
- HALL, A.E., HUTTER, O.F. et NOBLE, D. - 1963 - Current-voltage relations of Purkinje fibres in sodium deficient solutions. *J. Physiol.*, London, 166, 225-249.
- HALL, E.K. - 1954 - Effects of Ach and of epinephrine on the embryonic rat heart. *Anat. Rec.*, 118, 305-306.
- HALL, E.K. - 1957 - Acetylcholine and epinephrine effects on the embryonic rat heart. *J. Cell comp. Physiol.*, 49, 187-200.
- HARARY, I. et FARLEY, B. - 1960 - *In vitro* studies of single isolated beating heart cells. *Science*, 131, 1674.
- HARRIS, E.J. et BURN, G.P. - 1948 - Permeability of muscle cells. *Nature*, 162, 929-930.
- HARRIS, E.J. et HUTTER, O.F. - 1956 - The action of acetylcholine on the movements of potassium ions on the sinus venosus of the heart. *J. Physiol.*, London, 133, 58-59.
- HAUSWIRTH, O., NOBLE, D. et TSIEN, R.W. - 1968 - Adrenaline: mechanism of action on the pacemaker potential in cardiac Purkinje fibres. *Science*, 162, 916-917.
- HAUSWIRTH, O., NOBLE, D. et TSIEN, R.W. - 1969 - The mechanism of oscillatory activity at low membrane potentials in cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol.*, London, 200, 255-265.
- HAY, E.D. - 1963 - The fine structure of differentiating muscle in the salamander tail. *Z. Zellforsch.*, 59, 6-34.
- HERMANN, H. - 1932 - Le coeur. In: "ROGER et BINET". *Traité Physiol. norm. path.*, 6, 19-351. Masson Edit., Paris.
- HEUSON-STIENNON, J.A. - 1964 - Intervention de polysomes dans la synthèse des myofibrilles du muscle embryonnaire du rat. *J. Microsc.*, 3, 229-232.

- HIBBS, R.G. - 1959 - Electron microscopy of developing cardiac muscle in chick embryos. Amer. J. Anat., 99, 17-52.
- HOCHSTETTER, F. - 1906 - Die Entwicklung des Blutgefässsystems. Herwig's Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere. III, Pt. 2, 21-166.
- HODGKIN, A.L. - 1951 - The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle. Biol. rev., 26, 339-409.
- HODGKIN, A.L. et HOROWICZ, P. - 1959 - The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of frog muscle. J. Physiol., London, 158, 127-160.
- HODGKIN, A.L. et HUXLEY, A.F. - 1945 - Resting and action potentials in single nerves fibres. J. Physiol., London, 104, 176-195.
- HODGKIN, A.L. et HUXLEY, A.F. - 1952 a - Currents carried by sodium and potassium ion through the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol., London, 116, 449-472.
- HODGKIN, A.L. et HUXLEY, A.F. - 1952 b - The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. J. Physiol., London, 116, 473-496.
- HODGKIN, A.L. et HUXLEY, A.F. - 1952 c - The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. J. Physiol., London, 116, 497-506.
- HODGKIN, A.L. et HUXLEY, A.F. - 1952 d - A quantitative description of membrane currents and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol., London, 117, 500-544.
- HODGKIN, A.L., HUXLEY, A.F. et KATZ, B. - 1952 - Measurement of current-voltage relation in the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol., London, 116, 424-448.
- HODGKIN, A.L. et KEYNES, R.D. - 1955 a - Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo. J. Physiol., London, 128, 28-60.
- HODGKIN, A.L. et KEYNES, R.D. - 1955 b - The potassium permeability of giant nerve fibres. J. Physiol., London, 128, 61-88.
- HOFF, E.C., KRAMER, T.C., DU BOIS, D. et PATTEN, B.M. - 1939 - The development of the electrocardiogram of the embryonic chick heart. Amer. Heart J., 17, 470-488.

- HOFFMAN, B.F. et SUCKLING, E.E. - 1953 - Cardiac cellular potentials. Effect of vagal stimulation and acetylcholine. Amer. J. Physiol., 173, 312-320.
- HOFFMAN, B.F. et SUCKLING, E.E. - 1956 - Effect of several cations on transmembrane potentials of cardiac muscle. Amer. J. Physiol., 186, 317-324.
- HOFFMEISTER, H., LIEKFELD, K., RUSKA, H. et RYBAK, B. - 1961 - Sécrétions granulaires dans le coeur branchial de Myxine glutinosa. Z. Zellforsch., 55, 810-817.
- HOLTZER, H., ABBOTT, J.E. et CAVANAUGH, M.W. - 1959 - Some properties of embryonic cardiac myoblastes. Exp. Cell. Res., 16, 595-601.
- HUNT, T.E. - 1932 - Potencies of transverse levels of the chick blastoderm in the definitive streak stage. Anat. Rec., 55, 41-69.
- HUTTER, O.F. - 1957 - Mode of action of autonomic transmitter on the heart. Brit. Med. Bull., 13, 176-180.
- HUTTER, O.F. et NOBLE, D. - 1960 - Rectifying properties of cardiac muscle. Nature, 188, 495.
- HUTTER, O.F. et TRAUTWEIN, W. - 1955 - Effect of vagal stimulation on the sinus venosus of the frog's heart. Nature, 176, 512-513.
- HUTTER, O.F. et TRAUTWEIN, W. - 1956 - Vagal and sympathetic effects on the pacemaker fibers in the sinus venosus of the heart. J. Gen. Physiol., 39, 715-733.
- HUXLEY, A.F. et STÄMPFLI, R. - 1951 - Effect of potassium and sodium on resting and action potentials of single myelinated fibres. J. Physiol., London, 112, 496-508.
- IGNARRO, L.J. et SHIDEMAN, F.E. - 1968 - Appearance and concentrations of catecholamines and their biosynthesis in the embryonic and developing chick. J. Pharmacol. Exp. Therap., 159, 38-48.
- ISHIMA, Y. - 1968 - The effect of tetrodotoxine and sodium substitution on the action potential in the course of development of the embryonic chicken heart. Proc. Japan Acad., 44, 170-175.
- JAMIESON, J.D. et PALADE, D.E. - 1964 - Specific granules in atrial muscle cells. J. Cell Biol., 23, 151-172.
- JOHNSON, E.A. et TILLE, J. - 1960 - Changes in polarization resistance during the repolarization phase of the rabbit ventricular action potential. Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci., 38, 509-514.

- JOHNSON, E.A. et TILLE, J. - 1961 - Investigations of the electrical properties of cardiac muscle fibres with the aid of intracellular double-barrelled electrodes. J. Gen. Physiol., 44, 443-467.
- JOHNSTONE, P.N. - 1925 - Studies on the physiological anatomy of the embryonic heart. II. An inquiry into the development of irritability to electrical stimulation. Johns Hopkins Hosp. Bull., 36, 299-311.
- JOLY, S. et LIEURE, C. - 1938 - Recherches sur la culture des oeufs de Mammifères. Arch. Anat. Micr., 34, 307-374.
- JONES, D.S. - 1958 - Effects of acetylcholine and adrenalin on the experimentally uninnervated heart of the chick embryo. Anat. Rec., 130, 253-260.
- KATZ, B. - 1949 - Les constantes électriques de la membrane du muscle. Arch., Sci., Physiol., 3, 285-299.
- KAUFMANN, R., TRITTHART, H., RODENROTH, S. et ROST, B. - 1969 - Das mechanische und elektrische Verhalten isolierter embryonaler Herzmuskelzellen in Zellkulturen. Pflügers Arch., 311, 25-49.
- KENNEDY, B. et WEST, T.C. - 1967 - Effect of morphine on electrically induced release of autonomic mediators in the rabbit sinoatrial node. J. Pharmacol. Exp. Therap., 157, 149-158.
- KEYNES, R.D. - 1954 - The ionic fluxes in frog muscle. Proc. Roy. Soc., London, 142, 359-382.
- KLEIN, R.L. - 1960 - Ontogenesis of K and Na fluxes in embryonic chick heart. Amer. J. Physiol., 199, 613-618.
- KLEIN, R.L. - 1963 - High Na content of early embryonic chick heart. Amer. J. Physiol., 205, 370-374.
- KOELLE, G.B. et FRIEDENWALD, J.S. - 1949 - A histochemical method for localizing cholinesterase activity. Proc. Soc. Biol. med., 70, 617-622.
- KREHER, P., WALDEN, M. et TRICOCHÉ, R. - 1971 a - Action de l'acétylcholine et de l'adrénaline sur l'activité électrique intracellulaire du coeur de Pangolin (Manis tricuspis Rafinesque) à trois stades de sa croissance (foetus, impubère, pubère). C.R. Soc. Biol., 165, 2163-2166.
- KREHER, P., WALDEN, M. et TRICOCHÉ, R. - 1971 b - Influence de sécrétions thyroïdiennes sur l'activité électrique transmembranaire du coeur de Pangolin (Manis tricuspis Rafinesque). C.R. Soc. Biol., 165, 2397-2401.

- KRESPI, V. et SLEATOR, W.W. - 1966 - A study on the ontogeny of action potentials in chick embryo hearts. *Life Sci.*, 16, 1441-1446.
- KÜLB, F. - 1920 - Experimentelle Untersuchungen am Hühnerembryo., *Cremer's Beitr. t. Physiol.*, 1, 439.
- LANGER, G.A. - 1964 - Kinetic studies of calcium distribution in ventricular muscle of the dog. *Circul. Res.*, 15, 393-405.
- LANGER, G.A. et FRANK, J.S. - 1972 - Lanthanum in heart cell culture. Effect on calcium exchange correlated with its localization. *J. Cell Biol.*, 54, 441-455.
- LANZAVECCHIA, G. - 1957 - Studio al microscopio elettronico sull' embriologia del miocardio di pollo. *R.C. Ist. lomb. Sci.*, 92, 207-212.
- LAPLAUD, J., TRICOCHÉ, R. et GARGOUIL, Y.M. - 1960 - Electrogramme intracellulaire (E.I.C.) électrogramme externe et mécanogramme du coeur d'Axolotl (*Amblystoma tigrinum*). *C.R. Soc. Biol.*, 154, 1608-1612.
- LASSALLE, B. et GUILBAUT, P. - 1972 - Effets des inhibiteurs de perméabilité membranaire sur le potentiel d'action cardiaque du crabe *Carcinus moenas*. *C.R. Acad. Sci.*, 274, 1175-1178.
- LASZLO, D., ECKSTEIN, D.M., LEWIN, R. et STERN, K.G. - 1952 - Biological studies on stable and radioactive rare earth compounds. I. On the distribution of lanthanum in the mammalian organism. *J. Natl. Cancer Inst.*, 13, 559-571.
- LAVERAN, R. - 1878 - *Lancet*, 2, 896.
- LEAK, L. - 1969 - Electron microscopy of cardiac tissue in a primitive vertebrate *Myxine glutinosa*. *J. Morphol.*, London, 128, 131-157.
- LE DOUARIN, G. - 1963 - Etude de l'action des rayons X sur la physiologie et l'organogenèse du coeur embryonnaire chez le poulet. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 97, 643-759, Thèse ès-Sciences, Paris.
- LE DOUARIN, G. - 1965 - Etude au microscope électronique de la structure du mésenchyme précardiaque et des cellules du tube cardiaque avant le stade de la formation des myofibrilles. *C.R. Acad. Sci.*, 260, 973-976.
- LE DOUARIN, G., LE DOUARIN, N. et CUMINGE, D. - 1965 - Etude ultrastructurale des capacités d'autodifférenciation du mésoderme de l'aire cardiaque chez l'embryon de Poulet. *C.R. Acad. Sci.*, 260, 6998-7001.

- LE DOUARIN, G. et LIGNON, J. - 1971 - Ultrastructure du coeur de l'ammocète de Lampetra planeri. Bull. Assoc. Anat., 152, 551-557.
- LE DOUARIN, G. et NANOT, J. - 1967 - Différenciation in vitro de tissu myocardique à partir du mésoderme de l'embryon de Souris. C.R. Soc. Biol., 161, 1811-1813.
- LE DOUARIN, G., NANOT, J. et RENAUD, D. - 1966 - Sur la différenciation in vitro du mésenchyme précardiaque. C.R. Soc. Biol., 160, 1733-1735.
- LE DOUARIN, G., OBRECHT, G. et CORABOEUF, E. - 1964 - Activité électrique transmembranaire du coeur embryonnaire de Poulet explanté en culture organotypique. C.R. Acad. Sci., 258, 3911-3914.
- LE DOUARIN, G., OBRECHT, G. et CORABOEUF, E. - 1965 - Activité électrique transmembranaire de vésicules pulsatiles différenciées en culture organotypique par des fragments de l'aire précardiaque de l'embryon de poulet. C.R. Acad. Sci., 260, 287-290.
- LE DOUARIN, G., OBRECHT, G. et CORABOEUF, E. - 1966 - Déterminations régionales dans l'aire cardiaque présomptive mises en évidence chez l'embryon de poulet par la méthode microélectrophysiologique. J. Embryol. exp. Morph., 15, 153-167.
- LE DOUARIN, G. et RENAUD, D. - 1967 - Différenciation en milieu liquide et culture de longue durée du tissu myocardique embryonnaire. C.R. Soc. Biol., 161, 436-439.
- LE DOUARIN, G. et RENAUD, D. - 1969 - Etude morphologique et physiologique de la différenciation in vitro du mésoderme précardiaque de l'embryon de caille. Bull. Biol. Fr. Belg., 103, 453-468.
- LE DOUARIN, G., RENAUD, D., LIGNON, J. et NANOT, J.B. - 1968 - Influence d'un rythme imposé sur l'activité électrique de fragments ventriculaires du coeur de grenouille rendus automatiques par l'action du chlorure de baryum. C.R. Soc. Biol., 162, 1199-1205.
- LE DOUARIN, N. - 1964 - Etude expérimentale de l'organogenèse du tube digestif et du foie chez l'embryon de poulet. Bull. Biol. Fr. Belg., 98, 543-676.
- LE DOUARIN, N., LE DOUARIN, G. et RENAUD, D. - 1967 - Action du sulfate d'aminoguanidine sur la différenciation in vitro des cellules myocardiques. C.R. Soc. Biol., 161, 910-913.
- LEHMKÜHL, D. et SPERELAKIS, N. - 1963 - Transmembrane potentials of trypsin dispersed chick heart cells cultured in vitro. Amer. J. Physiol., 205, 1213-1220.

- LEHMKUHL, D. et SPERELAKIS, N. - 1967 - Electrical activity of cultured heart cells in factors influencing myocardial contractility. Ed. Acad. Press, N.Y., 245-278.
- LENFANT, J. et MIRONNEAU, J. - 1970 - Transport du sodium par le système de cinétique lente de la membrane myocardique sinusale de lapin. J. Physiol., Paris, 82, 263.
- LENFANT, J., MIRONNEAU, J., GARGOUIL, Y.M. et GALAND, G. - 1968 - Analyse de l'activité électrique spontanée du centre de l'automatisme cardiaque de lapin par les inhibiteurs de perméabilités membranaires. C.R. Acad. Sci., 266, 901-904.
- LENFANT, J., MIRONNEAU, J. et AKA, J.K. - 1972 - Activité répétitive de la fibre sino-auriculaire de grenouille: analyse des courants membranaires responsables de l'automatisme cardiaque. J. Physiol., Paris, 64, 5-18.
- LEPESCHKIN, E., SURAWICZ, B., HERRLICH, H.C. et HOFFMAN, B.F. - 1957 - Correlation between the electrocardiogram and the transmembrane action potential in potassium and calcium deficiency of the mammalian heart. Circulation, 16, 906-907.
- LIGNON, J. et LE DOUARIN, G. - 1971 - Action de substances adrénérgiques et cholinergiques sur l'activité spontanée du ventricule isolé de l'ammocète de Lampetra planeri. C.R. Acad. Sc., 273, 1302-1305.
- LILLIE, F.R. - 1952 - Lillie's development of the chick. An introduction to embryology. Henry Holt and Company, New-York.
- LINDNER, E. - 1957 - Submikroskopische Untersuchungen über die Herzentwicklung beim Hühnchen. Verh. Anat. Ges. 54. Versamml. Freiburg i. Br. 22-25 Sept.
- LINDNER, E. - 1960 - Myofibrils in the early development of chick hearts as observed with the electron microscope. Anat. Rec., 136, 234-235.
- LOWRY, O.H. - 1943 - Electrolytes in the cytoplasm. Biol. symp., 10, 233-245.
- LU, H.H., LANGE, G. et BROOKS, C. - 1965 - Factors controlling pacemaker action in cells of the sinoatrial node. Circul. Res., 17, 460-471.
- LUTTGAU, H.C. et NIEDERGERKE, R. - 1958 - The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. J. Physiol., London, 143, 486-505.

- MAC ALLISTER, R.E. et NOBLE, D. - 1966 - The time and voltage dependence of the slow outward current in cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol.*, London, 186, 632-662.
- MAC CARTY, L., LEE, W.C. et SHIDEMAN, F.E. - 1960 - Measurement of the inotropic effects of drugs on the innervated and non innervated embryonic chick heart. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 129, 315-321.
- MATSUMORI, C.L. - 1929 - Response of explanted embryonic cardiac tissue to epinephrine and acetylcholine. *Amer. J. Physiol.*, 97, 271-275.
- MEDA, E. - 1960 - Potenziali intracellulari in stadi diversi dello sviluppo del cuore embrionale di Pollo. *Bull. Soc. ital. Biol. sper.*, 36, 249-252.
- MEDA, E. et FERRONI, A. - 1960 - Differenziazione funzional precoce delle cellule miocardiche embrionali. *Arch. Fisiol.*, 59, 288-306.
- MIRONNEAU, J., LENFANT, J. et DRAMANE, K. - 1969 - Enregistrement de l'activité électrique au niveau du centre de l'automatisme et du myocarde auriculaire de lapin. *J. Physiol.*, Paris, 61, 190.
- MIRONNEAU, J., LENFANT, J. et GARGOUIL, Y.M. - 1969 a - Analyse, à l'aide d'un inhibiteur de la perméabilité membranaire (chlorure de manganèse), de l'action de l'adrénaline sur l'activité électrique spontanée du noeud sino-auriculaire de lapin. *C.R. Acad. Sci.*, 268, 1760-1763.
- MIRONNEAU, J., LENFANT, J. et GARGOUIL, Y.M. - 1969 b - Effets membranaires de l'adrénaline au niveau du centre de l'automatisme cardiaque de lapin: analyse à l'aide d'un inhibiteur de perméabilité (chlorure de manganèse). *J. Physiol.*, Paris, 61, 152.
- MONNEREAU-SOUSTRE, H. - 1970 - Modifications de l'électrogenèse cardiaque après surrenalectomie. Interprétation en fonction des variations des concentrations ioniques et des perméabilités membranaires spécifiques. Thèse ès-Sciences, Poitiers.
- LOORE, J.W., BLAUSTEIN, M.P., ANDERSON, N.C. et NARAHASHI, T. - 1967 - Basis of tetrodotoxin's selectivity in blockage of Squid axons. *J. Gen. Physiol.*, 50, 1401-1411.
- MOSCONA, H. et MOSCONA, A. - 1952 - The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J. Anat.*, 86, 287-301.
- NAKAJIMA, S., IWASAKI, S. et OBATA, K. - 1962 - Delayed rectification and anomalous rectification in frog's skeletal muscle membrane. *J. Gen. Physiol.*, 46, 97-115.

- NANOT, J. - 1971 - Aspects ultrastructuraux du myocarde de l'embryon de souris. Développement normal, différenciation in vitro et action de substances pharmacologiques. Thèse de 3ème cycle, Nantes.
- NANOT, J., BERMON, M. et LE DOUARIN, G. - 1973 - L'établissement de l'innervation du coeur chez l'embryon de souris étudié par l'imprégnation argentique et la fluorescence induite. C.R. Acad. Sci., 276, 625-628.
- NANOT, J. et LE DOUARIN, G. - 1970 - Etude au microscope électronique du myocarde du foetus de Souris: influence de l'adrénaline et de la noradrénaline sur la teneur en granules spécifiques. C.R. Soc. Biol., 164, 890-893.
- NANOT, J. et LE DOUARIN, G. - 1971 a - Ultrastructure du tissu myocardique différencié en culture in vitro à partir du mésoderme précardiaque de l'embryon de Souris. C.R. Soc. Biol., 165, 405-407.
- NANOT, J. et LE DOUARIN, G. - 1971 b - Aspects ultrastructuraux du myocarde de l'embryon de souris et de la différenciation in vitro du mésoderme précardiaque. Bull. Assoc. Anat., 152, 620-626.
- NARAHASHI, T., MOORE, J.W. et SCOTT, W.R. - 1964 - Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in Lobster giant axons. J. Gen. Physiol., 47, 965-974.
- NASTUK, W.L. et HODGKIN, A.L. - 1950 - The electrical activity of single muscle fibers. J. Cell comp. Physiol., 35, 39-74.
- NIEDERGERKE, R. et LUTTGAU, H.C. - 1957 - Calcium and the contraction of the heart. Antagonism between calcium and sodium ions. Nature, 179, 1066-1067.
- NIEDERGERKE, R. et ORKAND, R.K. - 1966 a - The dual effect of calcium on the action potential of the frog's heart. J. Physiol., London, 184, 291-311.
- NIEDERGERKE, R. et ORKAND, R.K. - 1966 b - The dependance of the action potential of the frog's heart on the external and intracellular sodium concentration. J. Physiol., London, 184, 312-334.
- NOBLE, D. - 1960 - Cardiac action and pacemaker potentiels based on the Hodgkin-Huxley equations. Nature, 188, 495-497.
- NOBLE, D. - 1962 - A modification to the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potentials. J. Physiol., London, 160, 317-352.
- NOBLE, D. - 1966 - Applications of Hodgkin-Huxley equations to excitable tissues. Physiol. Rev., 46, 1-50.

- NOBLE, D. et TSIEN, R.W. - 1968 - The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol.*, London, 195, 185-214.
- NOBLE, D. et TSIEN, R.W. - 1969 a - Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in Purkinje fibres. *J. Physiol.*, London, 200, 205-231.
- NOBLE, D. et TSIEN, R.W. - 1969 b - Reconstruction of the repolarization process in cardiac Purkinje fibres based on Voltage clamp measurements of membrane current. *J. Physiol.*, London, 200, 233-254.
- OBRECHT-COUTRIS, G. - 1970 - Etude électrophysiologique de l'initiation de l'automatisme dans le coeur d'embryon de Poulet. Thèse ès-Science, Orsay.
- OBRECHT-COUTRIS, G. - 1971 - Electrophysiologie du coeur embryonnaire. *Ann. Biol.*, 10, 323-340.
- OBRECHT-COUTRIS, G. et CORABOEUF, E. - 1967 - Sensibilité à la noradrénaline et à l'acétylcholine du myocarde embryonnaire de poulet. *J. Physiol.*, Paris, 59, 275-276.
- OBRECHT-COUTRIS, G., CORABOEUF, E. et LE DOUARIN, G. - 1966 - Inhibition post-stimulative de l'automatisme de fragments de coeur embryonnaire de Poulet cultivé in vitro. *J. Physiol.*, Paris, 58, 577.
- OBRECHT-COUTRIS, G., CORABOEUF, E. et LE DOUARIN, G., 1968 - Libération d'acétylcholine par le coeur embryonnaire de poulet avant le stade de l'innervation. *C.R. Acad. Sci.*, 267, 1102-1104.
- OBRECHT, G., LE DOUARIN, G. et CORABOEUF, E. - 1964 - Activité électrique transmembranaire de fragments de coeur embryonnaire de Poulet en culture organotypique. *J. Physiol.*, Paris, 56, 414-415.
- OBRECHT-COUTRIS, G., LE DOUARIN, G. et CORABOEUF, E. - 1968 - Aspects électrophysiologiques de l'automatisme du myocarde ventriculaire chez l'embryon de Poulet. *C.R. Acad. Sci.*, 267, 765-768.
- OLIVEIRA CASTRO, G.M. et PAES DE CARVALHO, A. - 1970 - Potassium -and sodium-induced changes in the electrical activity of heart cells "in vitro". *Acta Physiol., Latino Amer.*, 20, 242-251.
- OLIVO, O.M. - 1924 - Sull' inizio della capacità fuzionale dei tessuti contrattili nell' embrione di pollo, in relazione alla loro differenziazione strutturale e morfologica. I. Differenziazione strutturale e morfologica dell'abbozzo cardiaco. *Acc. Naz. Lincei*, 33, 209-212.

- OLIVO, O.M. - 1925 - Sull' inizio della funzione contrattile del cuore e dei mitoni dell'embrione di pollo in rapporto alla loro differenziazione morfologica e strutturale. Arch. f. Exper. Zellforsch., 1, 427-500.
- OLIVO, O.M. - 1928 - Précoce détermination de l'ébauche du coeur dans l'embryon de poulet et sa différenciation histologique et physiologique in vitro. C.R. Ass. Anat., 23, 1-18.
- OLIVO, O.M. - 1932 - Birefrangenza e miofibrille nei mioblasti del pollo. Bull. Soc. It. Biol. Sper., 7, 466-468.
- OLIVO, O.M. - 1964 - Différenciation précoce des myofilaments dans l'ébauche cardiaque de l'embryon de poulet. Bull. Ass. Anat., 127, 1-4.
- OLIVO, O.M., LASCHI, R. et LUCCHI, M.L. - 1964 - Prima fasi della fibrillogenesi nei mioblasti cardiaci di pollo. Acc. Naz. dei Lincci, 36, 790-793.
- OLIVO, O.M. et POSTELLI, T. - 1943 - Ricerche elettrocardiografiche sul miocardio embrionale di pollo coltivato in vitro. Mem. Acc. Sc. Ist. Bologna, 10, 203-226.
- OLIVO, O.M. et RICAMO, R. - 1948 - Le oscillazioni rapide di potenziale elettrico in espianti di miocardio embrionale coltivato in vitro registrato a grande velocità. Bull. Soc. It. Biol. Sper., 24, 135-137.
- ORTS-LLORCA, F. - 1963 - Influence of the endoderm on heart differentiation during the early stages of development of the chick embryo. Roux'Arch. Entwickl., 154, 533-551.
- ORTS-LLORCA, F. et RUANO-GIL, D. - 1965 - Influence of the endoderm on the heart differentiation. Roux'Arch. Entw. mech., 156, 368-370.
- OSTLUND, E. - 1954 - Distribution of catecholamines in lower animals and their effects on the heart. Acta Physiol. Scand., 31, suppl 112, 1-67.
- OTSUKA, M. - 1958 - Die Wirkung von Adrenalin auf Purkinje-Fasern von Säugetierherzen. Pflüger's Archiv., 266, 512-517.
- PAGER, J. - 1968 - Evolution structurale et ultrastructurale du tissu cardiaque en développement chez le fœtus de rat. Thèse de 3ème cycle, Lyon.
- PAGER, J. BERNARD, C. et GARGOUIL, Y.M. - 1965 - Evolution au cours de la croissance foetale des effets de l'acétylcholine au niveau de l'oreillette de rat. C.R. Soc. Biol., 159, 2470-2475.

- PALADE, G.E. - 1961 - Secretory granules in the atrial myocardium. *Anat. Rec.*, 139, 262.
- PAPPANO, A.J. - 1972 a - Sodium-dependent depolarization of non-innervated embryonic chick heart by acetylcholine. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 180, 340-349.
- PAPPANO, A.J. - 1972 b - Action potentials in chick atria. Increased susceptibility to blockade by tetrodotoxine during embryonic development. *Circul. Res.*, 31, 379-388.
- PAPPANO, A.J. et SPERELAKIS, N. - 1969 - Spike electrogenesis in cultured heart cells. *Amer. J. Physiol.*, 217, 615-624.
- PATTEN, B.M. - 1922 - The formation of the cardiac loop in the chick. *Amer. J. Anat.*, 30, 373-397.
- PATTEN, B.M. et KRAMER, T.C. - 1933 - The initiation of contraction in the embryonic chick heart. *Amer. J. Anat.*, 53, 349-375.
- PLATTNER, F. et HOU, C.L. - 1931 - Zur Frage des Angriffspunktes vegetativer Gifte. Versuche am Embryonalherzen und am Flimmerepithel. *Pflüger's Arch.*, 228, 281-294.
- PROSSER, C.L. - 1942 - An analysis of the action of acetylcholine on hearts particularly in arthropods. *Biol. Rev.*, 83, 145-164.
- RAWLES, M.E. - 1936 - A study in the localization of organ-forming areas in the chick blastoderm of the head-process stage. *J. Experiment. Zool.*, 72, 271-315.
- RAWLES, M.E. - 1943 - The heart-forming areas of the early chick blastoderm. *Physiol. Zool.*, 16, 22-43.
- RENAUD, D. - 1969 - Etude expérimentale des stades initiaux de la différenciation cardiaque chez l'embryon d'Oiseau. Thèse de 3ème cycle, Nantes.
- RENAUD, D. et LE DOUARIN, G. - 1968 a - Influence d'un support épithélial sur l'évolution histogénétique du mésoderme précardiaque de poulet cultivé in vitro. *C.R. Soc. Biol.*, 162, 1810-1814.
- RENAUD, D. et LE DOUARIN, G. - 1968 b - Influence de l'environnement tissulaire et des conditions de culture sur l'évolution du mésoderme précardiaque de l'embryon de poulet. *C.R. Acad. Sci.*, 267, 431-434.
- RENAUD, D. et LE DOUARIN, G. - 1969 - Etude électrophysiologique de l'influence de l'histogénèse et de la morphogénèse sur la différenciation cellulaire du myocarde. *C.R. Soc. Biol.*, 163, 959-963.

- RENAUD, D. et LE DOUARIN, G. - 1970 - Sensibilité à l'adrénaline du tissu myocardique différencié in vitro à partir du mésoderme précardiaque. Ann. Biol., 9, 325-334.
- RENAUD, D. et LE DOUARIN, G. - 1973 - Evolution au cours du développement de la perméabilité potassique des cellules cardiaques chez l'embryon de poulet. J. Physiol., Paris, sous presse.
- RENAUD, J.F. - 1973 - Etude de l'évolution en culture primaire des cardiomyoblastes embryonnaires de poulet. Les modifications des propriétés membranaires. Influence de l'insuline. Thèse de 3ème cycle, Nantes.
- RENAUD, J.F. et LE DOUARIN, G. - 1973 - Influence de l'âge de l'embryon donneur et de la concentration d'ensemencement sur l'évolution de la culture primaire de cellules cardiaques de poulet. C.R. Soc. Biol., sous presse.
- REUTER, H. - 1965 - Über die Wirkung von Adrenalin auf den cellulären Ca-Umsatz des Meerschweinschenvorhofs. Arch. Exp. Path. Pharmac., 251, 401-412.
- REUTER, H. - 1966 - Strom- Spannungsbeziehungen von Purkinje-Fasern bei verschiedenen extracellulären Calcium-Konzentrationen und unter Adrenalineinwirkung. Pflüger's Arch., 287, 357-367.
- REUTER, H. - 1967 - The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. J. Physiol., London, 192, 479-492.
- REUTER, H. et BEELER, G.W. - 1969 a - Sodium Current in Ventricular Myocardial Fibers. Science, 163, 397-399.
- REUTER, H. et BEELER, G.W. - 1969 b - Calcium Current and Activation of Contraction in Ventricular Myocardial Fibers. Science, 163, 399-401.
- RINALDINI, L.M. - 1959 - An improved method for the isolation and quantitative cultivation of embryonic cells. Exp. Cell Res., 16, 477-505.
- RINGER, S. - 1883 - A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. J. Physiol., London, 4, 29-42.
- ROBERTS, C.M., GIMENO, M.A. et WEBB, J.L. - 1965 a - On the role of acetylcholine in regulating the rate of the early chick embryo heart. J. Cell and Comp. Physiol., 66, 267-272.
- ROBERTS, C.M., GIEMENO, M.A. et WEBB, J.L. - 1965 b - Modification of receptors for acetylcholine, in the early embryonic heart. J. Cell and Comp. Physiol., 66, 273-280.

- ROBERTSON, W.V.B. et PEYSER, P. - 1951 - Changes in water and electrolytes of cardiac muscle following epinephrine. *Amer. J. Physiol.*, 166, 277-283.
- ROMANOFF, A.L. - 1960 - The Avian embryo. The Macmillan Co., New-York.
- ROUGIER, O. - 1968 - Le potentiel d'action cardiaque: interprétation d'après les données du "voltage clamp". Thèse ès-Sciences, Poitiers.
- ROUGIER, O. et VASSORT, G. - 1971 - Interaction des ions sodium et calcium dans le courant entrant lent et la contraction des fibres auriculaires cardiaques de grenouille. *J. Physiol.*, Paris, 63, 91A.
- ROUGIER, O., VASSORT, G. et GARNIER, D. - 1968 - Le potentiel d'action cardiaque (oreillette de grenouille) interprété d'après les données du "voltage clamp". *J. Physiol.*, Paris, 60, 534-535.
- ROUGIER, O., VASSORT, G., GARNIER, D., GARGOUÏL, Y.M. et CORABOEUF, E. - 1968 - Données nouvelles concernant le rôle des ions Na^+ et Ca^{++} sur les propriétés électrophysiologiques des membranes cardiaques: existence d'un canal lent. *C.R. Acad. Sci.*, 266, 802-805.
- ROUGIER, O., VASSORT, G., GARNIER, D., GARGOUÏL, Y.M. et CORABOEUF, E. - 1969 - Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. *Pflüger's Arch.*, 308, 91-110.
- ROUGIER, O., VASSORT, G. et ILDEFONSE, M. - 1968 - Analyse qualitative en voltage imposé du courant de membrane de la fibre musculaire striée. *C.R. Acad. Sci.*, 266, 1754-1757.
- ROUGIER, O., VASSORT, G. et STÄMPFLI, R. - 1968 - Voltage clamp experiments on frog atrial heart muscle fibres with the sucrose gap technique. *Pflüger's Arch.*, 301, 91-108.
- RUDNICK, D. - 1938 - Differentiation in culture of pieces of the early chick blastoderm. II. Short primitive streak stage. *J. Experiment. Zool.*, 79, 399-428.
- SCHREIBER, S.S. - 1956 - Potassium and sodium exchange in working frog heart. Effects of overwork external concentrations of potassium and ouabain. *Amer. J. Physiol.*, 185, 357-347.
- SHIGENOBU, K. et SPERELAKIS, N. - 1971 - Development of sensitivity to tetrodotoxin of chick embryonic hearts with age. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 3, 271-286.

- SHIGENOBU, K. et SPERELAKIS, N. - 1972 - Calcium current channels induced by catecholamines in chick embryonic hearts whose fast sodium channels are blocked by tetrodotoxin or elevated potassium. *Circul. Res.*, 31, 932-952.
- SHUMWAY, W. - 1940 - Stages in the normal development of Rana pipiens. *J. External. form. Anat. Rec.*, 78, 139-148.
- SIPPEL, T.O. - 1954 - *J. Experiment. Zool.*, 126, 205.
- SIPPEL, T.O. - 1955 - Properties and development of cholinesterase in the hearts of certain vertebrates. *J. Experiment. Zool.*, 128, 165-184.
- SMITH, R.B. - 1971 - Intrinsic innervation of the avian heart. *Acta anat.*, 79, 112-119.
- SPADOLINI, I. et GIORGIO, A. - 1921 - L'électrocardiogramma Embrionale. *Arch. Fisiol.*, 19, 479.
- SPERELAKIS, N. et LEHMKUHL, D. - 1964 - Effect of current on transmembrane potentials in cultured chick heart cells. *J. Gen. Physiol.*, 47, 895-927.
- SPERELAKIS, N. et LEHMKUHL, D. - 1965 - Insensitivity of cultured chick heart cells to autonomic agents and tetrodotoxin. *Amer. J. Physiol.*, 209, 693-698.
- SPERELAKIS, N. et SHIGENOBU, K. - 1972 - Changes in membrane properties of chick embryonic hearts during development. *J. gen. Physiol.*, 60, 430-453.
- STÄMPFLI, R. - 1954 - A new method for measuring membrane potentials with external electrodes. *Experientia*, 10, 508-509.
- SUEKANE, K. et CORABOEUF, E. - 1964 - Influence du changement de concentration en potassium et sodium sur l'action de l'acétylcholine et l'apparition de troubles du rythme. Enregistrement des phénomènes électriques intracellulaires du noeud sino-auriculaire de Lapin. *J. Physiol., Paris*, 56, 777-787.
- SUIGNARD, G. - 1973 - Contribution à l'étude expérimentale de la différenciation en culture in vitro du tissu précardiaque de l'embryon de poulet. Thèse de 3ème cycle, Nantes.
- SZENT-GYÖRGY, A.G. et HOLTZER, H. - 1963 - Reactivity of myosin to antibodies in cross striated chick myofibrils. *Bioch. Biophys. Acta*, 74, 709-713.
- SZEPSENWOL, J. et BRON, A. - 1936 - Origine et nature de l'innervation primitive du coeur chez les embryons d'Oiseaux (Canard, Poulet). *Rev. Suisse Zool.*, 45, 1-23.
- SZONTROCH, Z. - 1929 - Histogenèse des ganglions nerveux du coeur. *Bull. internat. Act. Polon.*, Cracovie, 2, 417-431. In: "ROMANOFF, 1960).

- THURESON-KLEIN, A. et KLEIN, R.L. - 1971 - Cation distribution and Cardiac Jelly in early Embryonic Heart: a histochemical and Electron Microscopic Study. J. Molec. Cell. Cardiol., 2, 31-40.
- TOTH, A - 1965 - Über das Aktionspotential von Herzmuskelzellen der Ratte während der Entwicklung. Sond. Z. Natursiss., 6, 136-137.
- TRAUTWEIN, W. - 1964 - Pathophysiologie des Herzflimmerns. Verh. Dtsch. Geis. Kreislaufforsch., 30, 40-56.
- TRAUTWEIN, W. et DUDEL, J. - 1958 - Zum Mechanismus der Membranwirkung des Acetylcholins an der Herzmuskelfaser. Pflüger's Arch., 266, 324-334.
- TRAUTWEIN, W. et KASSEBAUM, D.G. - 1961 - On the mechanism of spontaneous generation in the pace-maker of the heart. J. Gen. Physiol., 45, 317-330.
- TRAUTWEIN, W., KUFFLER, W.S. EDWARDS, S. - 1956 - Changes in membrane characteristics of heart during inhibition. J. Gen. Physiol., 40, 135-145.
- TRAUTWEIN, W. et ZINK, K. - 1952 - Über Membran- und Aktionspotentiale einzelner Myokardfasern des Kalt- und Warmblüterherzens. Pflüger's Arch., 256, 68-84.
- TRAUTWEIN, W. et SCHMIDT, R.F. - 1960 - Zur Membranwirkung des Adrenalins an der Herzmuskelfaser. Pflüger's Arch., 271, 715-726.
- TRAUTWEIN, W. et WITT, P.N. - 1952 - Der Einfluss des Strophantins auf das Ruhe- und Aktionspotential der geschädigten Herzmuskelfasern. Arch. Exper. Path. Pharmac., 216, 197-199.
- TRICOCHÉ, R. - 1967 - Spécificité de l'activité électrique transmembranaire du myocarde. Sécrétions endocriniennes et électrogenèse cardiaque. Thèse ès-Sciences, Poitiers.
- TRICOCHÉ, R., LAPLAUD, J., MONNEREAU, H. et GARGOUIL, Y.M. - 1961 - Modification par la métamorphose de l'activité électrique cellulaire du ventricule d'Amblystone. C.R. Soc. Biol., 155, 104-106.
- TUPPER, T. et POWERS, D.R. - 1972 - Determination of P_{Na} and P_K in an early embryonic system. Biophys. Soc. Anat. Meet. Abstr., 16, 68a.
- VAN BREEMEN, C. - 1969 - Blockade of membrane calcium fluxes by lanthanum in relation to vascular smooth muscle contractility. Arch. Inst. Physiol. Biochem., 77, 710-716.

- VAN MIEROP, L.S.H. - 1967 - Location of pacemaker in chick embryo heart at the time of initiation of heart beat. *Amer. J. Physiol.*, 212, 407-415.
- VASSORT, G., CORABOEUF, E. et GARGOUIL, Y.M. - 1968 - Action de l'adrénaline sur la composante lente de l'activité électrique du coeur de grenouille. *J. Physiol.*, Paris, 60, 564.
- VASSORT, G., ROUGIER, O. et FAVELIER, J. - 1971 - Influence du potentiel de membrane et des courants transmembranaires sur l'activité contractile des **faisceaux** sino-auriculaires de la grenouille. *Arch. internat. Physiol. Biochim.*, 79, 401-406.
- VASSORT, G., ROUGIER, O., GARNIER, D., SAUVIAT, M.P., CORABOEUF, E. et GARGOUIL, Y.M. - 1968 - Effets de l'adrénaline sur les courants entrants transmembranaires au cours de l'activité cardiaque. *C.R. Acad. Sci.*, 267, 1762-1765.
- VASSORT, G., ROUGIER, O., GARNIER, D., SAUVIAT, P., CORABOEUF, E. et GARGOUIL, Y.M. - 1969. Effects of adrenaline on membrane inward currents during the cardiac action potentiel. *Pflüger's Arch.*, 309, 70-81.
- VERNE, J. - 1954 - La cytochimie des estérases. *Ann. Biol.*, 30, 129-143.
- VINCENZI, F.F. et WEST, T.C. - 1963 - Release of automatic mediators in cardiac tissue by direct subthreshold electrical stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 141, 185-194.
- WAINRACH, S. et SOTELO, J.R. - 1961 - Electron microscope study of the developing chick embryo heart. *Zeitschr. Zellforsch.*, 55, 622-634.
- WALDEN, M. - 1971 - Activité électrique et courants ioniques transmembranaires de la fibre myocardique de singe. Thèse ès-Sciences, Abidjan.
- WALLON, G. - 1960 - Relation entre l'activité électrique et l'activité mécanique cardiaque. Action de divers agents physiques, ioniques et pharmacologiques. Thèse ès-Sciences, Poitiers.
- WALLON, G., CORABOEUF, E. et GARGOUIL, Y.M. - 1959 - Relation entre l'activité électrique et l'activité mécanique du coeur isolé de Mammifère perfusé dans une solution sans sodium. *C.R. Soc. Biol.*, 153, 1575-1578.
- WARE, F., BENNETT, A.L. et MAC INTYRE - 1955 - *Fed. Proc.*, 14, 158. (Cité par CORABOEUF, 1960).

- WEIDMANN, S. - 1951 - Effect of current flow on the membrane potential of cardiac muscle. J. Physiol., London, 115, 227-236.
- WEIDMANN, S. - 1955 a - The effect of calcium ions and local anesthetics on electrical properties of Purkinje fibres. J. Physiol., London, 129, 568-582.
- WEIDMANN, S. - 1955 b - The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium carrying system. J. Physiol., London, 128, 213-224.
- WEIDMANN, S. - 1955 c - Rectifier properties of Purkinje fibres. Amer. J. Physiol., 183, 671.
- WEIDMANN, S. - 1956 a - Elektrophysiologie der Herzmuskelfaser. Med. Verlag Hans Huber, Bern et Stuttgart.
- WEIDMANN, S. - 1956 b - Shortening of the action cardiac potential due to a brief injection of KCl following the onset activity. J. Physiol., London, 132, 157-163.
- WEIDMANN, S. - 1957 - Resting and action potentials of cardiac muscle. Ann. N.Y. Acad. Sci., 65, 663-678.
- WEIDMANN, S. - 1959 - Effect of increasing the calcium concentration during a single heart beat. Experientia, Basel, 15, 128-130.
- WEISS, G.B. et GOODMAN, Fr. - 1969 - Effects of lanthanum on contraction, calcium distribution and Ca^{45} movements in intestinal smooth muscle. J. Pharmacol. Expt. Therap., 169, 46-55.
- WERTHEIM-SALOMONSON, J.K.A. - 1913 - Das Elektrokardiogram von Hühnerembryonen. Arch. ges. Physiol., 153, 553-573.
- WEST, T.C., FALK, G. et CERVONI, P. - 1956 - Drug alteration of transmembrane potentials in atrial pacemaker cells. J. Pharmacol. Exper. Therap., 117, 245.
- WHIACRE, T.S., LONG, J.P. et WAHLEN, W.J. - 1966 - Transmural and vagal nerve stimulation of the right atrium of the Cat. Amer. J. Physiol., 210, 557-562.
- WILLIER, B.H. et RAWLES, M.E. - 1935 - Organ-forming areas in the early chick blastoderm. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 32, 1293-1296.
- WOLFF, Et. - 1933 - Réalisation expérimentale de monstres à coeur double. C.R. Soc. Biol., 112, 1090-1092.
- WOLFF, Et. - 1952 - La culture d'organes embryonnaires in vitro. Rev. Scient., 3317, 189-198.

- WOLFF, Et. et HAFFEN, K. - 1952 - Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro. Texas Rep. Biol. Med., 10, 463-472.
- WOODBURY, L.A., WOODBURY, J.M. et HECHT, H.H. - 1950 - Membrane resting and action potentials of single cardiac muscle fibers. Circulation, 1, 264-266.
- YEH, B.K. et HOFFMAN, B.F. - 1968 - The ionic basis of electrical activity in Embryonic Cardiac Muscle. J. Gen. Physiol., 52, 666-681.
- ZINGONI, U. - 1956 - L'effeto dell' aceticolina e dell' adrenalina sull' inotropismo sul cronotropismo e sul tono del cuore di embrione di pollo privo di elementi nervose. Arch. Fisiol., 56, 226-236.

